

# **Differentielle Aktivität des HNF1 $\alpha$ Insulators im transgenen Xenopus und in Zellkulturen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.  
des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften  
der Universität Duisburg-Essen  
Standort Essen

vorgelegt von

Daniela Plitzko

aus

Essen

Oktober 2003

Die der folgenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) in der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G.U. Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Grunz

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. D. Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2003

Zum Forschen gehört  
Glück,  
zum Erfinden Geist,  
und beide können beides  
nicht entbehren.

Johann Wolfgang von Goethe  
(1749-1832)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1 EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<u>1.1 Regulation der Genexpression in Eukaryoten</u>	1
<u>1.2 Allgemeine und gewebespezifische Transkriptionsfaktoren</u>	2
1.3 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$	3
<u>1.4 Organisation des Chromatins</u>	5
<u>1.5 DNA-Elemente an den Grenzen von Gendomänen („Boundary Elements“)</u>	6
<u>1.5.1 S/MAR-Elemente („Scaffold/Matrix Attachment Regions“)</u>	6
<u>1.5.2 Insulatoren</u>	8
<u>1.6 <i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus</u>	12
<u>1.6.1 Transgene <i>Xenopus laevis</i></u>	12
<u>1.7 Zielsetzung der Arbeit</u>	16
<b><u>2 MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>17</b>
<u>2.1 Chemikalien, Puffer, Oligonukleotide und Enzyme</u>	17
<u>2.2 Plasmide</u>	17
<u>2.3 Expressionsvektoren</u>	17
<u>2.4 Reporterplasmide</u>	18
<u>2.4.1 Reporterplasmide zur Herstellung transgener <i>Xenopus laevis</i></u>	18
<u>2.4.2 Reporterplasmide für zellbiologische Untersuchungen</u>	20
<u>2.5 Haltung und <i>in vitro</i> Befruchtung von <i>Xenopus laevis</i> Larven</u>	23
<u>2.5.1 Versuchstiere</u>	23
<u>2.5.2 <i>In vitro</i> Befruchtung von <i>Xenopus laevis</i> Eiern</u>	24
<u>2.5.3 Fixierung von <i>Xenopus laevis</i> Larven</u>	24
<u>2.6 Transgene <i>Xenopus laevis</i> Larven</u>	25
<u>2.6.1 Spermienkernpräparation</u>	25
<u>2.6.2 Herstellung transgener <i>Xenopus laevis</i></u>	25
<u>2.6.3 Mikroskopie</u>	26
<u>2.6.4 PCR-Analyse genomischer DNA</u>	26
<u>2.6.5 RT-PCR von <i>Xenopus laevis</i> Geweben</u>	27

<a href="#">2.7 Zellbiologische Methoden</a>	28
<a href="#">2.7.1 Zelllinien</a>	28
<a href="#">2.7.2 Kultivierung von HeLa-, HEK293- und FT02B-Zellen</a>	29
<a href="#">2.7.3 Transfektion mit Lipofectamine™</a>	29
<a href="#">2.7.4 Luciferase-Assay</a>	30
<a href="#">2.8 Gelretardationsanalyse (Bandshift)</a>	30
<a href="#">2.8.1 Annealing komplementärer DNA-Einzelsträngen</a>	30
<a href="#">2.8.2 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde FII</a>	31
<a href="#">2.8.3 Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation</a>	31
<a href="#">2.8.4 Gelretardations-Kompetitions-Assays, PhosphorImager</a>	31
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
<a href="#">3.1 HNF1<math>\alpha</math> wird in <i>Xenopus laevis</i> Larven in entodermalen und mesodermalen Geweben exprimiert</a>	33
<a href="#">3.2 Das Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP wird in entodermalen und mesodermalen Geweben exprimiert</a>	35
<a href="#">3.3 Die Expression des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP ist auf die Niere beschränkt und führt zu Mosaikexpression</a>	40
3.4 Deletionen zur Kartierung der 5'-Grenze des HNF1 $\alpha$ Promotors, der eine gewebespezifische Expression vermittelt	46
3.5 Ein mit Insulatoren flankiertes Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP vermittelt eine korrekte Expression des Transgens	54
<a href="#">3.6 Charakterisierung der Reporterlinien Ins(-594/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP und (-5949/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</a>	59
3.7 Analyse regulatorischer Elemente mit Transfektionen von HNF1 $\alpha$ Genkonstrukten	63
<a href="#">3.8 Analyse der „Enhancer Blocking“ Aktivität von Insulatoren in Zellkulturexperimenten</a>	66
<a href="#">3.8.1 „Enhancer Blocking“ Aktivität des <math>\beta</math>-Globin Insulators des Huhns</a>	66
<a href="#">3.8.2 „Enhancer Blocking“ Aktivität des <i>Xenopus</i> HNF1<math>\alpha</math> Promotors</a>	69
<a href="#">3.9 CTCF-Bindestellen im <i>Xenopus</i> HNF1<math>\alpha</math> Promotor</a>	72
<a href="#">3.10 Aufbau eines artifiziellen Promotors, der eine gewebespezifische Expression vermittelt</a>	75
<a href="#">3.10.1 Eine HNF4-Bindestelle des HNF1<math>\alpha</math> Promotors reicht nicht aus, um eine Expression von GFP zu vermitteln</a>	75

<a href="#">3.10.2 Ein Flankieren dieser HNF4-Bindestelle mit Insulatoren hat keinen Einfluss auf die Expression in <i>Xenopus</i></a> .....	77
<b><a href="#">4 DISKUSSION</a></b> .....	<b>81</b>
4.1 Endogenes HNF1 $\alpha$ wird in <i>Xenopus laevis</i> Larven in mesodermalen und entodermalen Geweben exprimiert.....	80
4.2 HNF1 $\alpha$ Promotoranalysen in transgenen <i>Xenopus</i> .....	81
<a href="#">4.3 Ein langes HNF1<math>\alpha</math> Promotorfragment ist für eine gewebespezifische Expression in transgenen <i>Xenopus</i> essentiell</a> .....	83
<a href="#">4.4 Ein kurzes HNF1<math>\alpha</math> Promotorfragment kann keine gewebespezifische Expression in transgenen <i>Xenopus</i> steuern</a> .....	84
<a href="#">4.5 Die 5'-Grenze des HNF1<math>\alpha</math> Promotors, der eine gewebespezifische Expression vermittelt, liegt stromaufwärts von Position -2269bp</a> .....	86
<a href="#">4.6 Ein regulatorischer Insulator im <i>Xenopus</i> HNF1<math>\alpha</math> Promotor</a> .....	87
<a href="#">4.6.1 Ein Insulator im <i>Xenopus</i> HNF1<math>\alpha</math> Promotor schützt vor chromosomalen Positionseffekten</a> .....	88
<a href="#">4.6.2 „Enhancer Blocking“ Aktivität des <i>Xenopus</i> HNF1<math>\alpha</math> Promotors</a> .....	90
<a href="#">4.6.3 Potentielle CTCF-Bindestellen im HNF1<math>\alpha</math> Promotor stromaufwärts von Position -2269bp</a> .....	92
<a href="#">4.6.4 Schutz vor chromosomalen Positionseffekten und „Enhancer Blocking“ Aktivität des <i>Xenopus</i> HNF1<math>\alpha</math> Promotors stellen separate Aktivitäten dar</a> .....	93
<a href="#">4.7 Vererbung transgener Reporter-DNA</a> .....	95
<a href="#">4.8 Eine HNF4-Bindestelle des HNF1<math>\alpha</math> Promotors reicht nicht aus, um eine Expression von GFP zu vermitteln</a> .....	96
<a href="#">4.9 Funktionelle Bedeutung von Insulatoren</a> .....	97
<b><a href="#">5 ZUSAMMENFASSUNG</a></b> .....	<b>100</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BEAD	Blocking Element Alpha/Delta
BEAF	Boundary-Element-Associated-Factor
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
cHS4	DNase I hypersensitive Stelle 4 aus dem $\beta$ -Globin-Gencluster des Huhns (auch 5'-HS4)
CMV	Cytomegalovirus-Promotor
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
CTCF	CCCTC-binding factor
C	Cytosin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
G	Guanin
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
ICR	Imprinted Control Region
IGF	Insulin-like Growth Factor
IPF	Insulin Promoting Factor
kb	Kilobasenpaare
LCR	Locus Control Region
MAR	Matrix Attachment Region
MBT	Mid-Blastula Transition
MMR	Marc's Modified Ringer
MODY	Maturity onset diabetes of the young
Mod(mdg4)	Modifier of mdg4
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEV	Position-Effect-Variegation
REMI	Restriction Enzyme-mediated Integration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SAR	Scaffold Attachment Region
scs	Special Chromatin Structure
SBP	scs Binding Protein
SDB	Sperm Dilution Buffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp1	Specifity Protein 1
Su(Hw)	Suppressor of Hairy-wing
T	Thymin
U	Units, Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
UPEs	Upstream Promoter Elements
zw	zeste-white

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 REGULATION DER GENEXPRESSION IN EUKARYOTEN

Grundlage vieler biologischer Prozesse in einer Zelle oder einem Organismus ist die Regulation der Genexpression. Differentielle Genaktivität ist die Antwort auf Umweltreize oder Veränderungen im Entwicklungsprogramm und spielt eine große Rolle für die unterschiedlichsten physiologischen Zustände eines Organismus. Der erste Schritt, die Übertragung von DNA-Information auf mRNA (Transkription) ist hierbei als Startelement von besonderer Bedeutung für die Genregulation. Die Transkription eukaryotischer Gene wird durch regulatorische Proteine kontrolliert, die an spezifische DNA-Elemente in Promotoren von Genen binden und als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Die unterschiedlichen Kombinationen und Aktivitäten der in einer Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren bestimmen letztlich die Identität dieser Zelle.

Die Aktivität eines basalen Promotors kann durch weitere Bindungssequenzen, die stromaufwärts gelegen sein können, gesteigert werden, wie die CCAAT-Box (McKnight and Tjian, 1986) und die Sp1-Box („specificity protein 1“), eine GC-reiche Sequenz, die in vielen Genen mit oder ohne TATA-Box gefunden wird (Dynan and Tjian, 1985). Alle diese Elemente sind essentiell für eine effiziente Transkription und werden als UPEs („upstream promoter elements“) bezeichnet. Neben diesem konstitutiven Promotorbereich kann man funktionell noch regulative Kontrollabschnitte unterscheiden, die mit den UPEs verflochten sind, aber auch stromaufwärts oder stromabwärts vom Promotorbereich gelegen sein können. Inzwischen konnten viele dieser *cis*-regulatorischen, d.h. spezifische Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine enthaltende, Elemente identifiziert werden, die signalabhängig durch Hormone, Wachstumsfaktoren u.a. die Promotoraktivität gewebe- oder zelltypspezifisch in verstärkender (Aktivator, Enhancer) oder hemmender (Silencer) Weise beeinflussen. So können auch DNA-Abschnitte, die stromaufwärts, stromabwärts oder innerhalb einer Transkriptionseinheit liegen, zum Teil über große Distanzen die Genexpression beeinflussen.



## 1.2 ALLGEMEINE UND GEWEBESPEZIFISCHE TRANSKRIPTIONS-FAKTOREN

Transkriptionsfaktoren, welche räumlich und zeitlich differenziert voneinander stromaufwärts des basalen Promotors eines Gens an UPEs binden, spielen eine wichtige Rolle sowohl für die konstitutive, als auch für die induzierbare, entwicklungsabhängige und gewebespezifische Genexpression.

Es lassen sich zwei Arten von Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Neben den basalen Transkriptionsfaktoren, die ubiquitär in jedem Zelltyp exprimiert werden (Buratowski, 1994), existieren die sogenannten zell- und gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription zelltypspezifischer Gene durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen regulieren. In Verbindung mit den basalen Transkriptionsfaktoren gewährleisten diese gewebespezifischen Faktoren, dass jeder Zelltyp neben ubiquitären Proteinen eine charakteristische Ausstattung zellspezifischer Proteine enthält. So weisen Muskelzellen aufgrund vorhandener muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren typische Proteine, wie z.B. Aktin, Myosin und Troponin auf, die in anderen Zelltypen fehlen. Die Bedeutung gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren konnte insbesondere für die Differenzierung von Zellen gezeigt werden. Das Einbringen myogener Transkriptionsfaktoren wie MyoD und Myogenin in Fibroblasten führt zu der Ausbildung des muskelspezifischen Phänotyps (Olson and Rosenthal, 1994). Untersuchungen zur Differenzierung anderer Zelltypen, wie beispielsweise Hepatozyten, zeigen jedoch, dass die alleinige Expression eines Transkriptionsfaktors zur Zelldetermination häufig nicht ausreicht (Sladek and Darnell, 1992). Vielmehr regulieren verschiedene Transkriptionsfaktoren kooperativ die Expression leberspezifischer Gene.

In ihrem molekularen Aufbau weisen viele Transkriptionsfaktoren eine modulare Zusammensetzung einzelner sogenannter Strukturdomänen auf, die gleichzeitig funktionelle Domänen repräsentieren. Derartige Funktionsdomänen erfüllen z.B. die Aufgaben der spezifischen DNA-Erkennung und DNA-Bindung (DNA-Bindungsdomänen) oder der Transkriptionsaktivierung (Transaktivierungsdomänen).

### 1.3 DER GEWEBESPEZIFISCHE TRANSKRIPTIONSFAKTOR HNF1 $\alpha$

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$ ) wird bei Säugern in Niere, Leber, Magen, Darm und Pankreas exprimiert (Blumenfeld et al., 1991; De Simone et al., 1991; Baumhueter et al., 1990; Kuo et al., 1990). Auch bei *Xenopus* konnte das Protein in Pronephros (erste Form der Niere bei Vertebraten), Leber und Darm nachgewiesen werden (Bartkowski et al., 1993). Die Transkription des HNF1 $\alpha$  Gens startet in der frühen Embryogenese, kurz nach der Ausbildung einer Blastula in Stadium 8,5 („Mid-Blastula Transition“, MBT) (Weber et al., 1996).

Die Promotorelemente, welche eine Aktivierung von HNF1 $\alpha$  während der Embryogenese generieren, sind zwischen Säugern und *Xenopus* weitestgehend konserviert (Abbildung 1).

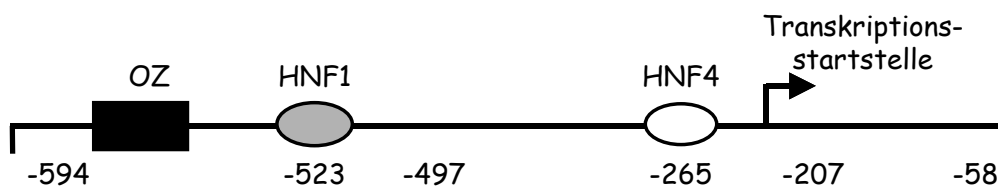


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors. Es konnten vier regulatorische Elemente identifiziert werden, welche für die embryonale Aktivierung des HNF1 $\alpha$  Gens wichtig sind. Zu diesen Elementen gehören das OZ-Element, die HNF1- und HNF4-Bindestelle und die Transkriptionsstartstelle. Alle diese Elemente, mit Ausnahme der HNF1-Bindestelle, konnten auch im HNF1 $\alpha$  Promotor der Ratte detektiert werden, was die Konservierung dieser Elemente in der Evolution aufzeigt. Die Positionen beziehen sich auf die Distanz zur Translationsstartstelle (ATG).

So umfasst der HNF1 $\alpha$  Promotor ein OZ-Element, welches für eine Aktivierung des Promotors essentiell zu sein scheint (Zapp et al., 1993) und mit dem maternalen Faktor OZ-1 interagiert (Ovsenek et al., 1992). Solche regulatorischen OZ-Elemente wurden bereits als Aktivatoren für die *Xenopus* Promotoren GS17 und N-CAM beschrieben (Ovsenek et al., 1992; Krieg et al., 1993). Während GS17 nur bis zur späten Gastrulation aktiv ist, werden die übrigen Gene, in deren Promotoren OZ-Elemente gefunden wurden, lebenslang in den Organismen in spezifischen Geweben exprimiert. Basierend auf den unterschiedlichen gewebespezifischen Expressionsprofilen dieser Gene wird vermutet, dass OZ-Elemente die zygotische Transkription zwar aktivieren, für die Aktivität des Gens in gewebespezifischen Bereichen des sich entwickelnden Embryos jedoch andere spezifische regulatorische Elemente benötigt werden.

Neben diesem OZ-Element weist der *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotor Bindestellen für HNF1 und HNF4 auf, welche für die Aktivierung des Promotors essentiell sind (Holewa et al., 1996).

Die HNF4-Bindestelle wird von dem Transkriptionsfaktor HNF4 erkannt, einem Mitglied der Kernrezeptor-Superfamilie (Sladek, 1994). Da HNF4 in der Embryogenese bereits als maternales Protein vorliegt, könnten HNF4 Proteine am Anfang einer Transkriptionskaskade liegen, die zu einer Ausdifferenzierung von Zellen führt. Die Aktivierung von HNF1 $\alpha$  durch HNF4 könnte somit eine Verbindung von maternalen Transkriptionsfaktoren und zellspezifischer Expression liefern.

Das Vorliegen einer HNF1-Bindestelle im HNF1 $\alpha$ -Promotor deutet auf eine Autoregulation hin, bei der eine Akkumulation von HNF1 $\alpha$ -Transkripten nach der zygotischen Transkription die HNF1 $\alpha$ -Expression fördert. Die Bindestelle scheint zusätzlich von HNF1 $\beta$  erkannt zu werden, da dieser eng verwandte Transkriptionsfaktor an die gleiche Sequenz wie HNF1 $\alpha$  binden kann (Tronche and Yaniv, 1992). Da HNF1 $\beta$  in der embryonalen *Xenopus* Entwicklung bereits vor HNF1 $\alpha$  auftritt (Demartis et al., 1994; Pogge v.Strandmann et al., 1997), könnte HNF1 $\beta$  über die HNF1-Bindestelle die Aktivierung von HNF1 $\alpha$  steuern, bevor eine Autoregulation durch HNF1 $\alpha$  zum Tragen kommt. Dies wird durch Untersuchungen von Rattenembryonen gestützt, bei denen das Auftreten von HNF1 $\beta$  einer Akkumulation von HNF1 $\alpha$  vorangeht (De Simone et al., 1991).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Aktivierung von HNF1 $\alpha$  während der Embryogenese vermutlich durch mehrere Faktoren beeinflusst wird. Die Initiation der zygotischen Transkription erfolgt durch das OZ-Element. In einem zweiten Schritt fördert der maternale Transkriptionsfaktor HNF4 die Aktivierung von HNF1 $\alpha$ , während die Aktivierung in einem späteren Embryonalstadium von Transkriptionsfaktoren übernommen wird, welche sich aus Genen ableiten, die zygotisch transkribiert werden. Zu diesen Genen zählen sowohl akkumuliertes HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$  als auch HNF4, welches zu diesem Zeitpunkt im Embryo transkribiert wird (Holewa et al., 1996).

Zur Identifizierung regulatorischer Elemente, welche für eine gewebespezifische Aktivierung von HNF1 $\alpha$  in transgenen *Xenopus* Larven essentiell sind, wurden verschiedene HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente mit dem Reportergen GFP fusioniert und als Transgen in *Xenopus* eingebracht (Ryffel and Lingott, 2000). Es zeigte sich, dass für eine korrekte Expression des HNF1 $\alpha$  Promotors ein Promotorelement von Position -5949bp bis -58bp relativ zur Translationssstartstelle essentiell ist. Dieses Promotorkonstrukt wird sowohl im mesodermalen Pronephros als auch in den entodermalen Geweben Darm und Leber exprimiert. Demgegenüber ist ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) nicht ausreichend, um eine gewebespezifische Expression des Transgens in entodermalen Geweben

zu steuern. Die Expression dieses kurzen Promotorkonstruktes ist auf den mesodermalen Pronephros beschränkt. Neben einer schwachen allgemeinen Expression im Embryo konnte bei einigen Larven auch eine Expression des Transgens im Auge beobachtet wurde. Ferner waren bei diesem Genkonstrukt auch einzelne Zellen stark fluoreszierend (Ryffel and Lingott, 2000).

Durch die Analyse von Deletionskonstrukten und mutierten Promotorfragmenten konnte der HNF1 $\alpha$  Promotor in zwei unterschiedlich aktive Komponenten zerlegt werden. Ein HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-207), welches einen Bereich von Position -5949bp bis -207bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst, vermittelt eine Expression ausschließlich im Pronephros. Da das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben exprimiert wird, scheint der Bereich zwischen den Positionen -207bp und -58bp essentiell für eine entodermale Expression des Transgens zu sein. Im Gegensatz dazu ist die Expression eines HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-5949/-58), in welchem die HNF4-Bindestelle mutiert wurde, auf die Leber und den Darm beschränkt (Ryffel and Lingott, 2000). Die Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotors konnte folglich in einen mesodermalen und einen entodermalen Teil zerlegt werden.

## 1.4 ORGANISATION DES CHROMATINS

Die Erbsubstanz einer haploiden menschlichen Zelle besteht aus  $3 \times 10^9$  Basenpaaren und erfordert für ihre Verpackung in den nur wenige Mikrometer großen Zellkern eine hochorganisierte Komprimierung. Die im Zellkern befindliche DNA bildet zusammen mit einer Gruppe basischer Proteine, den Histonen, das sogenannte Chromatin. Mikroskopisch lassen sich zwei unterschiedlich dichte Packungszustände des Chromatins unterscheiden, das Euchromatin und das Heterochromatin. Diese Packungszustände korrelieren mit einer bestimmten Aktivität der dort lokalisierten Gene. Das Euchromatin liegt während der Interphase nur schwach verpackt vor und ist der Ort einer aktiven Genexpression. Das optisch dunkler erscheinende Heterochromatin liegt häufig am Rand des Zellkerns, ist stark kondensiert und weitgehend transkriptionsinaktiv. Diese Strukturierung der DNA beeinflusst deren Zugänglichkeit und somit die Expression bestimmter DNA-Bereiche.

Die erste Verpackungsstufe der DNA bildet das Nukleosom, in welchem 146bp der Doppelhelix um ein Oktamer aus den basischen Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden sind. Der DNA-Abschnitt zwischen den Nukleosomen hat eine variable Länge von 0 bis 60

Basenpaaren und wird als Linker-DNA bezeichnet (Kornberg, 1977; Allan et al., 1980; Stein et al., 1994; Kornberg, 1977). Diese besitzt eine hohe Sensitivität gegenüber DNA-abbauenden Enzymen. Das Histon H1 bindet sowohl an das Nukleosom als auch an die Linker-DNA. Wechselwirkungen zwischen den H1-Molekülen führen zur Ausbildung einer weiteren Verpackungsform der DNA, der 30nm-Faser.

Die gängige Modellvorstellung der Chromatinstruktur höherer Ordnung geht von einer Organisation des Chromatins in unabhängige schlaufenförmige Domänen aus, wodurch die funktionelle Unabhängigkeit einzelner Chromatinabschnitte gewährleistet werden kann. Die Schlaufenstruktur wird durch die Bindung von an der Basis der Schleifen gelegenen DNA-Sequenzen an die Kernmatrix ausgebildet. So bildet jede Schlaufe eine unabhängige funktionelle Einheit (Zlatanova and van Holde, 1992).

## **1.5 DNA-ELEMENTE AN DEN GRENZEN VON GENDOMÄNEN („BOUNDARY ELEMENTS“)**

Die DNA-Sequenzen, welche die oben beschriebenen schlaufenförmigen Chromatindomänen begrenzen, haben nicht nur eine strukturelle Bedeutung, sondern sind auch in die Regulation der Genexpression involviert. Es gibt zwei unterschiedliche Klassen von DNA-Elementen, S/MAR-Elemente und Insulatoren, welche an den Grenzen von Gendomänen lokalisiert sind, und zusammenfassend als „Boundary Elements“ bezeichnet werden (Gerasimova and Corces, 1996; Labrador and Corces, 2002). Während S/MAR-Elemente als strukturgebende Domänengrenzen identifiziert wurden, werden Insulatoren aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften, „Enhancer Blocking“ Aktivität und Schutz vor chromosomalen Positionseffekten, funktionell charakterisiert. Es ist folglich nicht sicher auszuschliessen, dass S/MARs und Insulatoren die gleiche Art von Regulationselementen darstellen, die aufgrund einer unterschiedlichen Charakterisierung unterschiedlich bezeichnet werden.

### **1.5.1 S/MAR-ELEMENTE („SCAFFOLD/MATRIX ATTACHMENT REGIONS“)**

S/MAR-Elemente sind definiert als genomische Regionen, welche die Fähigkeit besitzen, *in vitro* an isolierte Kernmatrizen zu binden. Durch die Verankerung an die Kernmatrix bilden sie so die Basis der Chromatinschleifen. Diese Elemente lassen sich mit zwei unterschiedlichen Methoden nachweisen. Nach Art ihrer Untersuchung wurden sie als MARs

(„Matrix attachment regions“) (Cockerill and Garrard, 1986; Cockerill, 1990) oder SARs („Scaffold attachment regions“) (Mirkovitch et al., 1984) bezeichnet. Da sich zeigte, dass beide Methoden die gleichen Elemente nachweisen, werden sie inzwischen häufig zusammenfassend als S/MARs bezeichnet.

Eine typische Eigenschaft dieser Elemente ist ein AT-Gehalt von ungefähr 70%. S/MARs weisen keine Homologien auf, jedoch konnten wiederholt auftretende Sequenzmotive identifiziert werden. Beispielsweise kommen häufig Bindungsstellen für Topoisomerase II vor. Typische Sequenzmotive sind weiterhin das ATATTT-Motiv (Cockerill and Garrard, 1986; Mielke et al., 1990), Motive, die zu einer gebogenen DNA-Konformation („bending“) führen, und poly(dAdT)-Bereiche (Adachi et al., 1989; Kas et al., 1989).

Neben ihrer strukturgebenden Funktion hinsichtlich der Ausbildung der Chromatinschleifen konnte gezeigt werden, dass S/MARs auch Einfluss auf die Genregulation nehmen können. Transfektionsexperimente in Säugerzellen zeigten eine transkriptionsfördernde Wirkung verschiedener S/MARs (Stief et al., 1989; Klehr et al., 1991; Poljak et al., 1994; Kalos and Fournier, 1995; Stunkel et al., 2000). Der transkriptionsfördernde Effekt tritt nur nach stabiler Integration ins Genom auf (Klehr et al., 1991; Schubeler et al., 1996; Kalos and Fournier, 1995; Stunkel et al., 2000; Allen et al., 2000), was S/MARs von Enhancern unterscheidet, welche auch transient wirken können. Obwohl eine Korrelation der *in vitro* Matrixbindung mit der transkriptionsfördernden Eigenschaft gezeigt werden konnte (Bode et al., 1992), scheint die Matrixbindung allein kein ausreichendes Kriterium für die Transkriptionssteigerung zu sein (Phi-Van and Stratling, 1996). Der Mechanismus der Transkriptionsverstärkung ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist denkbar, dass S/MARs durch ihre Bindung an die Kernmatrix Gene in Kernkompartimente dirigieren, welche eine hohe Konzentration von Transkriptionsfaktoren besitzen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass S/MARs mit Mechanismen assoziiert sind, welche den Kondensationsgrad des Chromatins beeinflussen. Beispielsweise interagiert das S/MAR-bindende Protein SAF-A mit einer Histonacetyltransferase (Martens et al., 2002), welche eine für Transkriptionsfaktoren zugängliche Chromatinstruktur fördert. Weiterhin wirken S/MARs einer DNA-Methylierung entgegen (Dang et al., 2000), welche über MeCP2 Histondeacetylasen rekrutiert und als erster Schritt der Ausbildung einer reprimierenden Chromatinstruktur angesehen wird (Razin, 1998).

Weiterhin konnte für S/MAR-Elemente aus dem Lysozym *locus* des Huhns sowie aus dem humanen Apolipoprotein B *locus* und dem  $\alpha$ 1-Antitrypsin *locus* beobachtet werden, dass sie flankierten Transgenen eine vom Integrationsort unabhängige Expression ermöglichen (Stief

et al., 1989; Kalos and Fournier, 1995; Namciu et al., 1998). Mit dieser Eigenschaft von S/MARs ergibt sich eine enge Verbindung zu Insulatoren (Isolatoren; vom englischen „insulators“), welche im Gegensatz zu S/MARs aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden.

### 1.5.2 INSULATOREN

Es gibt zwei klassische Kriterien, einen Insulator zu definieren. Ursprünglich wurden sie durch ihre Fähigkeit detektiert, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen. Die zweite Eigenschaft dieser Insulatoren ist die sogenannte „Enhancer Blocking“ Aktivität. Bei Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor blockieren Insulatoren die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer.

Die ersten experimentellen Beweise spezifischer DNA-Sequenzen mit insulatorischer Aktivität wurden mit der Identifizierung von *scs* und *scs'* („special chromatin structure“) erbracht, welche die *hsp70* Hitzeschockgene von *Drosophila* flankieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Sequenzen das *Drosophila* Gen „white“ bei einer Flankierung vor Positionseffekten schützen können (Kellum and Schedl, 1991). Das Expressionslevel des „white“ Gens beeinflusst unmittelbar die Augenfarbe von *Drosophila*-Fliegen. Während eine schwache Expression des Gens in einem Phänotyp der Fliegen mit hellgelben Augen resultiert, hat eine starke Genexpression eine rote Augenfarbe zur Folge. *Drosophila*, welche das „white“ Gen als Transgen integriert haben, zeigen eine hohe Variabilität in der Augenfarbe, welche von hellgelb bis rot rangiert. Diese Variabilität ist vermutlich abhängig von Regulationselementen und der Chromatinstruktur in der Nähe der Integrationsstelle, an welcher das Transgen in das Genom integriert ist. Ein Flankieren des Transgens mit den Elementen *scs* und *scs'* verhindert diese Variabilität in der Augenfarbe der transgenen *Drosophila*. Die transgenen *Drosophila* zeigen eine einheitlich hellgelbe Augenfarbe, die aus einer niedrigen Expression des „white“ Gens resultiert. Darüber hinaus besitzen diese Elemente die Fähigkeit, bei einer Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer verhindern zu können (Kellum and Schedl, 1992). Sowohl für *scs* als auch für *scs'* konnten Proteine identifiziert werden, welche mit der Insulatoraktivität dieser Elemente assoziiert sind. Das Gen *zw5* („zeste-white“) kodiert für das Protein SBP („*scs* binding protein“), welches acht Zinkfinger aufweist und an eine 24bp große Region des Insulators *scs* binden kann (Gaszner et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass mehrere Kopien eines Oligonukleotids, welches eine Erkennungssequenz für SBP aufweist, eine Interaktion zwischen Enhancer und Promotor in

einem transgenen Assay verhindern können. Mutationen innerhalb dieser Erkennungssequenz, welche eine Bindung von SBP *in vitro* verhindern, resultieren in einem Verlust der „Enhancer Blocking“ Aktivität *in vivo*. Im Gegensatz dazu bindet der Insulator scs' zwei unterschiedliche Splicevarianten des Proteins BEAF32 („boundary-element-associated factor“), BEAF32A und BEAF32B (Zhao et al., 1995; Hart et al., 1997). Mit DREF konnte ein drittes Protein identifiziert werden, welches an scs' binden kann. Dieses Protein kann mit schwacher Affinität an Bindungsstellen von BEAF32 binden. Die überlappende Bindungsspezifität zwischen DREF und BEAF32 deutet darauf hin, dass diese beiden Proteine um die Bindung an die DNA konkurrieren (Hart et al., 1999).

Ein zweites Insulatorelement aus *Drosophila*, gypsy, ist ein Retrotransposon und mit keiner Domänengrenze assoziiert. Es wurde in gewebespezifischen Mutationen entdeckt, die durch eine Insertion von gypsy zwischen Promotor und Enhancer und den daraus resultierenden „Enhancer Blocking“ Effekten verursacht wurden (Geyer and Corces, 1992). Ein für diese „Enhancer Blocking“ Aktivität verantwortliches Protein ist Su(Hw) („Suppressor of Hairy-wing“) (Holdridge and Dorsett, 1991). In einigen, aber nicht in allen, Fällen benötigt der gypsy Insulator ein zweites Protein Mod(mdg4) (Modifier of mdg4) (Gerasimova et al., 1995; Gause et al., 2001; Ghosh et al., 2001). Neben der „Enhancer Blocking“ Aktivität besitzt gypsy die Fähigkeit, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen (Roseman et al., 1993).

Der am besten charakterisierte Vertebraten-Insulator ist in der 5'-Region des  $\beta$ -Globin-Genclusters des Huhns lokalisiert. Diese Region beinhaltet einen Bereich hypersensitiver DNA, d.h. in diesem Bereich ist die DNA mehr als 100-mal sensitiver gegenüber dem enzymatischen Angriff mit DNaseI als das übrige Chromatin. Da die Empfindlichkeit gegen DNaseI die Zugänglichkeit der DNA im Chromatin widerspiegelt, deuten diese hypersensitiven Stellen auf Bereiche hin, in denen die DNA freiliegt und nicht in der normalen nucleosomalen Struktur organisiert ist. So wird vermutet, dass sich diese hypersensitiven Bereiche vor dem Start der Transkription bilden und wahrscheinlich eine Voraussetzung für die Initiation der Transkription darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass ein 1,2kb großes Fragment des  $\beta$ -Globin-Gens, welches die hypersensitive Stelle enthält (5'-HS4 oder cHS4), die Expression eines Reportergens für Neomycinresistenz in K562-Zellen reduzieren kann, wenn dieses zwischen einem humanen  $\gamma$ -Globin Promotor und einem stromaufwärts gelegenen Enhancer des Maus  $\beta$ -Globin-Genlocus lokalisiert ist (Chung et al., 1993). Neben dieser „Enhancer Blocking“ Aktivität kann der  $\beta$ -Globin Insulator ebenso wie die oben beschriebenen Elemente scs und scs' das „white“ Gen vor Positionseffekten in *Drosophila* schützen (Chung et al.,



1993). Auch schützt dieser Insulator in Vertebraten-Zelllinien vor Positionseffekten und wirkt einem Expressionsverlust durch Verhinderung von Histondeacetylierung entgegen (Pikaart et al., 1998). Ebenso wie der 5'-HS4 Insulator des Huhns, welcher zwischen den  $\beta$ -Globin-Genen und einem unabhängig regulierten 5'-gelegenen Folatrezeptorgen liegt, weist auch die 3'-Region des  $\beta$ -Globin-Genclusters, welche auf der anderen Seite von einem unabhängig regulierten Geruchsrezeptor umgeben ist, „Enhancer Blocking“ Aktivität auf (Saitoh et al., 2000).

Es stellte sich heraus, dass ein Großteil der Insulatoraktivität in einem 250bp großen GC-reichen „Core“-Fragment liegt, welches die DNaseI-hypersensitive Stelle beinhaltet (Chung et al., 1997). Mit „DNA-Footprinting“ konnten verschiedene Regionen innerhalb dieses „Core“-Fragmentes identifiziert werden, an die spezifisch Proteine binden (Region I-V). Von diesen Regionen ist nur eine Region (FII) mit der „Enhancer Blocking“ Aktivität des Insulators assoziiert (Bell et al., 1999). Es zeigte sich, dass dieses 42bp große Fragment zugleich eine Bindestelle für das ubiquitär exprimierte Protein CTCF („CCCTC-binding factor“) aufweist. CTCF ist ein hochkonserviertes Protein in Vertebraten (Mensch, Maus, Huhn, Xenopus). Es bindet mit unterschiedlichen Anteilen seiner elf Zinkfinger 40-50bp lange DNA-Bereiche mit variabler Basenkomposition, die nur einen geringen Konsensus in ihrer Sequenz zeigen. Dies charakterisiert CTCF als einen multivalenten Transkriptionsfaktor. CTCF besitzt vielfältige Rollen in Transkriptionsaktivierung und -inaktivierung und bindet auch an andere Vertebraten-Insulatoren (Ohlsson et al., 2001). Die CTCF-Bindestelle im 5'-HS4 Insulator des Huhns ist essentiell für die „Enhancer Blocking“ Aktivität, nicht jedoch für die Fähigkeit des Insulators, vor Einflüssen des umliegenden Chromatins zu schützen (Recillas-Targa et al., 2002).

Beispiele für weitere Insulatoren, welche sich zwischen unterschiedlich regulierten Domänen befinden und CTCF-Bindestellen besitzen, sind der humane BEAD Insulator („blocking element alpha/delta“), der die TCR $\alpha$ - und TCR $\delta$ -Gene und deren Enhancer voneinander trennt (Zhong and Krangel, 1997; Zhong and Krangel, 1999; Robinett et al., 1997) sowie die „Repeat Organizer“ zwischen den 40S rRNA-Genen in Xenopus (Robinett et al., 1997).

Die Insulator-Funktion ist nicht grundsätzlich konstitutiv, sondern kann auch reguliert werden. Am Beispiel der elterlich geprägten Gene IGF-2 und H19 konnte gezeigt werden, dass durch eine Methylierung der CTCF-Bindestelle die Bindung des Proteins an die DNA und somit die insulatorische Wirkung verhindert werden kann. Die „Imprinted Control Region“ zwischen den Genen IGF-2 und H19 wird im maternal vererbten Allel von CTCF gebunden, was die Aktivierung von IGF-2 durch einen stromabwärts gelegenen Enhancer

verhindert. Im paternal vererbten Allel hingegen kann CTCF aufgrund von Methylierung nicht binden und IGF-2 wird exprimiert (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000). Eine Modulierung der Insulatoraktivität kann auch beim Fab-8 Insulator beobachtet werden, welcher die entwicklungsspezifisch regulierten Enhancer iab-7 und iab-8 in *Drosophila* voneinander trennt. Die Anwesenheit einer „Promoter-Targeting-Sequence“ erlaubt die Aktivierung des 3' gelegenen Abd-B Promotors durch iab-7, obwohl der Insulator zwischen diesen Elementen gelegen ist (Zhou and Levine, 1999). Der dieser Regulation zugrunde liegende Wirkungsmechanismus ist jedoch nicht bekannt.

Die molekulare Wirkungsweise von Insulatoren ist noch weitgehend unverstanden. Zur Erklärung der „Enhancer Blocking“ Aktivität existieren verschiedene Modellvorstellungen (Bell and Felsenfeld, 1999). So ist es denkbar, dass der Insulator ein aktivierendes Molekül oder Signal abfängt, welches vom Enhancer in Richtung Promotor ausgesendet wird. Dieses Modell könnte die orientierungsabhängige Wirkungsweise des Insulators erklären, bislang konnte jedoch kein entsprechendes Molekül oder Signal identifiziert werden. Alternativ könnten Insulatoren auch über eine Beeinflussung der Chromatinstruktur wirken. Wie oben beschrieben bindet an den gypsy Insulator das Zinkfinger-Protein Su(Hw), welches wiederum mit dem Faktor Mod(mdg4) interagiert, der die Insulator-Wirkung modifiziert (Gerasimova et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Su(Hw)/Mod(mdg4)-Komplex im Interphasekern zu Clustern in der Nähe der Kernperipherie zusammengelagert ist und die dazwischen liegende DNA in Schleifen angeordnet wird (Gerasimova et al., 2000). So ist es denkbar, dass ein Enhancer nicht innerhalb anderer Schleifen gelegene Promotoren aktivieren kann. An der korrekten Ausbildung der Schleifenstruktur scheinen Proteine der Trithorax- und Polycomb-Gruppe beteiligt zu sein, da Mutationen in den entsprechenden Genen die Zusammenlagerung der Insulator-Komplexe verhindern (Gerasimova and Corces, 1998). Mit dieser Eigenschaft des gypsy Insulators, das Chromatin in Schleifen zu organisieren, und seiner Fähigkeit, an die Kernmatrix zu binden (Nabirochkin et al., 1998), kann wiederum eine enge Verbindung zu S/MAR-Elementen gezogen werden.

## 1.6 *XENOPUS LAEVIS* ALS MODELLORGANISMUS

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* stellt ein attraktives Modell dar, die Entwicklung von Vertebraten auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen. Die Tiere eignen sich hervorragend für die Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung, da sie sich einfach in Aquarien halten und züchten lassen und durch Gonadotropin-Injektion die Ablage einer großen Zahl von Eiern stimuliert werden kann. Die Eier lassen sich *in vitro* befruchten und kultivieren und sind durch ihre Größe von 1-2mm Durchmesser vielen Manipulationen wie Mikroinjektionen und Transplantationen zugänglich. Da die Embryogenese dieser Tiere außerhalb des Muttertieres erfolgt und die Embryonen transparent sind, lassen sie sich in allen Entwicklungsstadien analysieren. Die frühe Embryogenese von *Xenopus* wurde von Nieuwkoop und Faber beschrieben und in Stadien eingeteilt (NF-Stadien), die den jeweiligen Entwicklungsstand markieren und fortlaufenden Nummern zugeordnet sind (Nieuwkoop and Faber, 1956).

Die Injektion von DNA oder RNA in frühe *Xenopus* Embryonen bietet die Möglichkeit, Genprodukte überzuexprimieren, um so die Funktion eines spezifischen Proteins während der Embryogenese untersuchen zu können. Die Genexpression injizierter DNA erfolgt frühestens mit Beginn der zygotischen Transkription in Stadium 8,5, da sie durch einen Promotor räumlich und zeitlich kontrolliert wird (Yasuda and Schubiger, 1992). Eine Manipulation früher Entwicklungsstadien ist folglich nicht möglich. Im Gegensatz dazu wird die injizierte RNA unmittelbar nach der Injektion translatiert, so dass durch diese Methode auch frühe Entwicklungsstadien manipuliert werden können. Ein Nachteil der DNA- und RNA-Injektionen besteht darin, dass sowohl die injizierten Nukleinsäuren als auch die translatierten Proteine im Embryo nur begrenzt stabil sind und mit der Zeit abgebaut werden, so dass diese Methoden für die Untersuchung späterer Entwicklungsstadien nur begrenzt geeignet sind.

Die Attraktivität von *Xenopus* als Modellorganismus wurde im Jahre 1996 gesteigert, als eine Methode zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* Embryonen veröffentlicht wurde, die es erlaubt, DNA stabil in das Genom zu integrieren (Kroll and Amaya, 1996). Diese Methode revolutionierte die Analyse der späten Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*.

### 1.6.1 TRANSGENE *XENOPUS LAEVIS*

Die im Jahre 1996 von Kroll und Amaya entwickelte Methode zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* Embryonen ermöglicht die stabile Integration von DNA in das Genom. Die Methode beruht auf der Restriktionsenzym-vermittelten Integration („restriction enzyme

mediated integration“, REMI) transgener DNA in *Xenopus* Spermienkerne. Ein Gemisch aus permeabilisierten Spermienkernen und transgener DNA wird mit Restriktionsenzym und Eiextrakt inkubiert. Das verwendete Restriktionsenzym generiert Doppelstrangbrüche im Chromatin der Spermienkerne. Die Funktion des Eiextraktes besteht vermutlich in der teilweisen Dekondensation des Chromatins der Spermienkerne. Die Verwendung von Restriktionsenzym und Eiextrakt fördert so die Rekombination und Integration der transgenen DNA in die Spermienkerne. Das Spermienkern/DNA-Gemisch wird in unbefruchtete *Xenopus* Eier injiziert, wobei pro Ei jeweils ein Spermienkern transplantiert wird. Abhängig von verschiedenen Einflüssen, u.a. stellt die Qualität der unbefruchteten Eier einen limitierenden Faktor dar, teilen sich 20-30% der injizierten Eier. 5-40% dieser geteilten Eier entwickeln sich normal bis zur freischwimmenden *Xenopus* Larve (Kroll and Amaya, 1996). Die REMI-Technik stellt eine wesentliche Verbesserung gegenüber einer früher publizierten Methode dar, bei der eine *Xenopus* Zelllinie (X-C) mit Plasmid-DNA transfiziert wurde und die Kerne der transfizierten Kerne wahlweise in entkernte oder nicht entkernte unbefruchtete *Xenopus* Eier transplantiert wurden (Kroll and Gerhart, 1994). Mit dieser Technik entstanden vorwiegend aneuploide Embryonen, die nur selten die Neurulation überlebten.

Mit Hilfe der REMI-Technik können Promotoranalysen von Genen durchgeführt werden. Als transgene DNA dienen Promotorkonstrukte, welche an das grün-fluoreszierende Protein („green fluorescence protein“, GFP) gekoppelt sind. Die REMI-Technik bietet gegenüber der transgenen Technik in anderen Vertebraten den Vorteil, dass das Transgen bereits vor der Befruchtung in das männliche Genom integriert, so dass es im optimalen Fall in jeder Zelle des sich entwickelnden Embryos vorliegt. Analysen regulatorischer Elemente lassen sich daher direkt am Stammtier durchführen, so dass auf die Herstellung transgener Zelllinien prinzipiell verzichtet werden kann. Die Aktivität des Promotors und Expression von GFP lässt sich unter Fluoreszenzlicht an lebenden Tieren leicht detektieren.

Neben konstitutiv aktiven Promotoren wie dem Cytomegalovirus (CMV) Promotor werden auch zelltypspezifische Promotoren in transgenen *Xenopus* Embryonen zeitlich und räumlich korrekt aktiviert (Kroll and Amaya, 1996; Ryffel and Lingott, 2000; Sparrow et al., 2000a). Durch die Analyse von Deletionskonstrukten und mutierten Promotorfragmenten wurden im HNF1 $\alpha$  Promotor regulatorische Elemente detektiert, welche die Expression von GFP in Pronephros, Leber und Darm kontrollieren (Ryffel and Lingott, 2000). Auch im Bix4 Promotor und im Xbra Promotor konnten auf diese Weise regulatorische Elemente identifiziert werden, welche die gewebespezifische Expression von GFP während der Gastrulation steuern (Casey et al., 1999; Lerchner et al., 2000). In weiteren Studien wurde die

Aktivität des  $\gamma$ 1-Crystallin Promotors in der Linse (Offield et al., 2000), die Aktivität des Rhodopsin Promotors in den Photorezeptoren der Retina (Knox et al., 1998) und die Aktivität verschiedener Promotoren aus Ratte und Maus im Pankreas, in der Leber und im Darm transgener *Xenopus* Larven untersucht (Beck and Slack, 1999).

Neben Promotoranalysen lassen sich mit Hilfe der REMI-Technik auch funktionelle Studien durchführen. Um Hinweise auf die Funktion spezifischer Genprodukte zu erlangen, können Genprodukte von Wildtypen oder Mutanten überexprimiert werden. Die Überexpression einer dominant-negativen Mutante des FGF-Rezeptors („fibroblast growth factor“) führt zu transgenen Embryonen, die eine abnormale Entwicklung von Rumpf und Schwanz zeigen. Die fehlerhafte Entwicklung der Körperachse deutet darauf hin, dass FGF-Signale nicht nur für die Mesoderminduktion, sondern auch für die korrekte Mesodermentwicklung während der Gastrulation erforderlich sind (Kroll and Amaya, 1996). Verschiedene Untersuchungen hinsichtlich der Metamorphose zeigten, dass bei transgenen Tieren, welche eine TypIII Deiodinase (D3) unter der Kontrolle des CMV Promotors überexprimieren, die Metamorphose inhibiert ist. Die Entwicklung dieser Larven stoppt in Stadium 60 bis 61. Die Tiere resorbieren weder die Kiemen noch den Schwanz und sterben schließlich (Huang et al., 1999). Transgene *Xenopus* Larven, die *Xenopus laevis* Prolactin oder Rinder Prolactin unter der Kontrolle des CMV Promotors überexprimieren, entwickeln sich zu Fröschen mit einem permanenten Schwanz, dessen Muskel am Ende der Metamorphose zwar weitgehend resorbiert ist, dessen Fibroblasten aber weiter proliferieren, so dass ein breiter Flossensaum entsteht (Huang and Brown, 2000b).

Die transgene DNA integriert zufällig in das männliche Genom, so dass das Transgen in jedem transgenen Embryo an unterschiedlichen Integrationsorten und in unterschiedlichen Kopienzahlen vorliegt. Die Experimente von Kroll und Amaya demonstrieren, dass in jeder Zelle 5-35 Transgenkopien vorliegen, die an 4-8 chromosomalen Stellen entweder als einzelne Kopie oder als eine Kette aus 2-6 Kopien integriert sind (Kroll and Amaya, 1996). Daher lassen sich in Abhängigkeit vom Integrationsereignis selbst bei der Verwendung des starken Cytomegalovirus (CMV) Promotors individuelle Unterschiede in der Expression des Transgens beobachten (Marsh-Armstrong et al., 1999). Zur Absicherung eines Phänotyps müssen daher zahlreiche Stamtiere analysiert werden.

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Transgen an nachfolgende Generationen vererbt wird (Marsh-Armstrong et al., 1999; Bronchain et al., 1999). Da die Nachkommen das Transgen am gleichen chromosomalen *locus* in der gleichen Kopienzahl integriert haben, sollten Phänotypen, die an den Nachkommen einer transgenen Linie

auftreten, einheitlich sein. Dies bestätigte sich erstmals bei der Analyse von F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Larven, welche das Xenopus Wachstumshormon unter der Kontrolle des CMV Promotors überexprimierten. Die transgenen Larven waren wesentlich größer als nicht-transgene Kontrolllarven, zeichneten sich aber untereinander durch eine einheitliche Grösse aus (Marsh-Armstrong et al., 1999; Huang and Brown, 2000a).

## 1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  wird bei *Xenopus laevis* in der frühen Larvalentwicklung sowohl in entodermalen Geweben (Darm und Leber) als auch im mesodermalen Pronephros (erste Form der Niere bei Vertebraten) exprimiert (Bartkowski et al., 1993). Da keine Erkenntnisse über eine Expression von HNF1 $\alpha$  bei *Xenopus* im Pankreas oder im Mesonephros (persistierende Form der Niere bei Amphibien) vorlagen, sollte im Verlauf dieser Arbeit die Expression von HNF1 $\alpha$  in diesen Geweben analysiert werden.

Untersuchungen an transgenen *Xenopus* Embryonen zeigten, dass für eine korrekte Expression des HNF1 $\alpha$  Promotors sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben ein Promotorelement von Position -5949bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle essentiell ist. Demgegenüber ist ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) nicht ausreichend, um eine korrekte Expression des Transgens in entodermalen Geweben zu steuern (Ryffel and Lingott, 2000). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte durch das Einbringen verschiedener HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukte mit Deletionen zwischen den Positionen -5949bp und -594bp der regulatorische Bereich kartiert werden, der für eine korrekte Expression des Promotors essentiell ist.

Der Verlust entodermaler Expression und die häufig auftretende Mosaikexpression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) deutet auf ein regulatorisches Insulatorelement des HNF1 $\alpha$  Promotors hin, welches den Promotor des Transgens von umliegenden Regulationselementen der Integrationsstelle isolieren kann. Es sollte daher untersucht werden, ob der gut beschriebene Insulator 5'-HS4 des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns (Chung et al., 1993) die Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorkonstruktes in seiner Spezifität beeinflussen kann, so dass eine korrekte Expression des Transgens erfolgt.

Neben diesem Schutz vor chromosomalen Positionseffekten weist ein Insulator die Fähigkeit auf, bei einer Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor die Aktivierung des Enhancers durch den Promotor verhindern zu können. Verschiedene Fragmente des HNF1 $\alpha$  Promotors sollten in Transfektionsexperimenten hinsichtlich ihrer „Enhancer Blocking“ Aktivität analysiert werden.

Die „Enhancer Blocking“ Aktivität eines Vertebraten-Insulators ist abhängig von funktionellen Bindestellen für den multivalenten Transkriptionsfaktor CTCF. Mit Hilfe von Gelretardationsanalysen sollten potentielle CTCF-Bindestellen des HNF1 $\alpha$  Promotors kartiert werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 CHEMIKALIEN, PUFFER, OLIGONUKLEOTIDE UND ENZYME**

Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Serva (Heidelberg) bezogen. Falls nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer und Lösungen nach den Angaben in Sambrook et al. (1989) hergestellt. Oligonukleotide stammten von der Firma Life Technologies (Karlsruhe). Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

### **2.2 PLASMIDE**

Molekularbiologische Untersuchungen wie Restriktionsverdaue, Gelelektrophoresen, Ligationen, Transformationen und die Anzucht von Bakterien erfolgten, soweit nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989). Die Herstellung kompetenter Bakterien (*E.coli* DH5 $\alpha$ ) erfolgte mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Cohen et al., 1972). Die Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen erfolgte durch das „QIAquick PCR Purification Kit“ oder das „QIAEXII Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden). Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (10-20 $\mu$ g) aus Bakterienkulturen erfolgte mit einer Methode, die auf alkalischer Lyse beruht (Sambrook et al., 1989). Große Mengen Plasmid-DNA (100-500 $\mu$ g) wurden mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) gewonnen. Sequenzierungen wurden vom Sequenzierlabor SEQLAB GmbH (Göttingen) oder vom Sequenzierservice der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen (Institut für Humangenetik) durchgeführt.

### **2.3 EXPRESSIONSVEKTOREN**

Der Expressionsvektor pCSGFP2 wurde von Enrique Amaya (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. pCSGFP2 exprimiert eine GFP-Variante, welche die Mutationen F64L und S65T enthält und im Vergleich zu Wildtyp GFP mit einer 35-mal stärkeren Signalintensität fluoresziert (Zernicka-Goetz et al., 1996).



## 2.4 REPORTERPLASMIDE

### 2.4.1 REPORTERPLASMIDE ZUR HERSTELLUNG TRANSGENER *XENOPUS LAEVIS*

Die Reporterplasmide **(-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP** und **(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP** wurden wie bei Ryffel und Lingott (2000) beschrieben verwendet. Die Reporterplasmide **(-3932/-58)HNF1 $\alpha$ GFP**, **(-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP** bzw. **(-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP** wurden von Gerhart U. Ryffel zur Verfügung gestellt. Die Positionen beziehen sich jeweils auf die Distanz zur Translationsstartstelle (ATG).

#### **Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP**

Das Reporterplasmid Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP wurde hergestellt, indem über die NotI-Schnittstelle des Vektors pCSGFP2 der unten aufgeführte Adapter 1 eingeführt wurde, welcher die Schnittstellen BglII und EcoRI enthält. In diese Schnittstellen konnte ein BamHI-EcoRI-Fragment mit einer doppelten Kopie des 5'-HS4 Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns kloniert werden, welches aus dem Vektor pJC13.1 (Chung et al., 1993) isoliert wurde. Um die bakterielle Plasmidsequenz, welche zur Klonierung benötigt wird, vor der Verwendung des Reporterplasmides als Transgen durch einen NotI-Verdau aus dem Vektor rausschneiden zu können, wurde der Adapter 2 über die SalI-HindIII-Schnittstellen in den Vektor kloniert, welcher eine weitere NotI-Schnittstelle aufweist. Durch den SalI-HindIII-Verdau des Vektors wurde gleichzeitig der CMV Promotor aus dem Vektor geschnitten. Aus dem Vektor pJC13.1 wurde ein BamHI-SalI-Fragment mit einer weiteren doppelten Kopie des 5'-HS4 Insulators isoliert, welches über BamHI-SalI in den Vektor kloniert werden konnte. Mit Hilfe einer PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion) wurde ein Fragment des Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotors, welches einen Bereich von -594bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle aufweist, amplifiziert. Das HNF1 $\alpha$ -Amplikon wies am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle auf, so dass das Amplikon nach einem BamHI-BglII-Verdau als BamHI-BglII-Fragment in die BamHI-Schnittstelle des Vektors kloniert werden konnte. Die Sequenz des HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft.

**Verwendete DNA-Adapter:**

- **Adapter 1 zur Einführung der BglII-EcoRI-Schnittstellen:**

Oligonukleotid 1: 5'-GGCCCAGATCTTCGGAATTCGC-3'; Oligonukleotid 2 (Gegenstrang):  
 5'-GGCCGCGAATTCGAAGATCT-3'  
BglIIEcoRI  
EcoRIBglII

- **Adapter 2 zur Einführung der NotI-Schnittstelle:**

Oligonukleotid 1: 5'-TCGAGGCGGCCGCGTCGACA-3'; Oligonukleotid 2 (Gegenstrang):  
 5'-AGCTTGTCGACGCGGCCGCC-3'  
NotI  
NotI

Restriktionsenzym-spezifische Erkennungssequenzen sind markiert. Zur Herstellung der Adapter wurde ein Gemisch aus jeweils 25µl Oligonukleotid 1 und 2 (2µM) bei 95°C für 2 Minuten erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

**Amplifikation des HNF1α Promotorfragmentes (-594/-58):**

- **PCR-Primer: (-594/-58)HNF1α**

Sense-Primer I (5355-5374bp): 5'-CGGGATCCGG GTATCTCTCTTCCCCTCTC-3';  
BamHI  
 Antisense-Primer II (5873-5892bp): 5'-GAAGATCT GGGAGTCCATGCTCTACCC-3';  
BglII

Amplikon: 537bp

- **Reaktionsansatz:**

10µl Template (~50ng); 1µl Primer I (25pmol/µl); 1µl Primer II (25pmol/µl); 1µl dNTPs (10mM); 5µl 10x Puffer; 1µl PWO-Polymerase (Seqlab); 31µl H<sub>2</sub>O

- **Amplifizierungsprotokoll:**

94°C für 2 Minuten; 25 x (94°C für 45 Sekunden, 60°C für 1 Minute, 72°C für 1 Minute); 72°C für 10 Minuten

**Ins(-278/-215)HNF1αGFP bzw. (-278/-215)HNF1αGFP**

Das Reporterplasmid Ins(-278/-215)HNF1αGFP wurde analog zum Reporterplasmid Ins(-594/-58)HNF1αGFP hergestellt. Es wurde jedoch ein Fragment des Xenopus HNF1α Promotors mit Hilfe einer PCR amplifiziert, welches den Bereich von -278bp bis -215bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst. Das HNF1α-Amplikon wies am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle auf, so dass das Amplikon nach einem BamHI-BglII-Verdau als BamHI-BglII-Fragment in die BamHI-Schnittstelle des Vektors kloniert werden konnte. Die Sequenz des HNF1α-Promotorfragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft.

Zur Klonierung des Reporterplasmides (-278/-215)HNF1αGFP wurde der oben aufgeführte Adapter 2 in den Vektor pCSGFP2 kloniert. Über die BamHI-Schnittstelle konnte das entsprechende Fragment des HNF1α Promotors (-278/-215) in den Vektor kloniert werden.

### Amplifikation des HNF1 $\alpha$ Promotorfragmentes (-278/-215):

- **PCR-Primer: (-278/-215)HNF1 $\alpha$**

Sense-Primer I (5673-5690bp): 5'-CGGGATCCCG CACTTTGTGGGGTCCAAA-3';  
BamHI HNF1α (5673-5690bp)

Antisense-Primer II (5716-5735bp): 5'-GAAGATCTTCCTTCCAAGGTTTCATCTTTAT-3';  
BglIIHNF1α (5716-5735bp)

Amplikon: 62bp

- **Reaktionsansatz und Amplifizierungsprotokoll** wurden wie oben beschrieben verwendet.

## 2.4.2 REPORTERPLASMIDE FÜR ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Vektoren pGL3-Basic, pGL3-Promotor und pGL3-Enhancer wurden von Promega erworben.

**pGL3-PromEnh**

Zur Herstellung des Reporterplasmides pGL3-PromEnh wurde der SV40 Enhancer des Vektors pGL3-Enhancer mit PCR amplifiziert. Das Amplikon wies am 5'-Ende eine XhoI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine SalI-Schnittstelle auf, so dass es nach einem XhoI-SalI-Verdau als XhoI-SalI-Fragment in die SalI-Schnittstelle des Vektors pGL3-Promotor kloniert werden konnte. Die Sequenz des SV40 Enhancers wurde durch Sequenzierung überprüft.

### Amplifikation des SV40 Enhancers aus dem Reporterplasmid pGL3-Enhancer:

- **PCR-Primer:**

Sense-Primer I (2012-2030bp): 5'-CCGCTCGAGCGG **CGATGGAGCGGAGAATGG**-3';  
XhoI

Antisense-Primer II (2231-2249bp): 5'- ACGCGTCTCGACGT GCTGTGGAATGTGTGTCAG-3';  
Sall

Amplikon: 237bp

- **Reaktionsansatz:**

10µl Template (~50ng); 1µl Primer I (25pmol/µl); 1µl Primer II (25pmol/µl); 1µl dNTPs (10mM); 5µl 10x Puffer; 1µl PWO-Polymerase; 31µl H<sub>2</sub>O

- **Amplifizierungsprotokoll:**

94°C für 2 Minuten; 25 x (94°C für 45 Sekunden, 58°C für 1 Minute, 72°C für 1 Minute); 72°C für 10 Minuten

### **pGL3-Ins**

Das Reporterplasmid pGL3-Ins wurde hergestellt, indem ein BamHI-SalI-Fragment mit einer doppelten Kopie des 5'-HS4 Insulators (erhalten aus pJC13.1) in die BamHI-SalI-Schnittstellen des Vektors pGL3-PromEnh kloniert wurde. Zur Vergrößerung des Abstandes zwischen den Schnittstellen BamHI und SalI im Vektor pGL3-PromEnh wurde über die BamHI-Schnittstelle der Adapter 3 eingefügt (**pGL3-PromEnh(L)**).

- **Adapter 3 zur Vergrößerung des Abstandes zwischen BamHI und SalI:**  
Oligonukleotid 1: 5'-GATCCTGGCCAATTGAATTCGGCCAATTACTAGTA-3'; Oligonukleotid 2 (Gegenstrang): 5'-GATCTACTAGTAATTGGCCGAATTCAATTGGCCAG-3'

### **Ins-pGL3**

Das Reporterplasmid Ins-pGL3 wurde hergestellt, indem das BamHI-SalI-Fragment mit einer doppelten Kopie des 5'-HS4 Insulators in die BglII-XhoI-Schnittstellen des Vektors pGL3-PromEnh(L) kloniert wurde. Zur Vergrößerung des Abstandes zwischen den Schnittstellen BglII und XhoI im Vektor pGL3-PromEnh(L) wurde der Adapter 4 über die XhoI-Schnittstelle eingefügt (**pGL3-PromEnh2(L)**).

- **Adapter 4 zur Vergrößerung des Abstandes zwischen BglII und XhoI:**  
Oligonukleotid 1: 5'-TCGAGTTAAGGCATATGTTAAGGGCCCTTG-3'; Oligonukleotid 2 (Gegenstrang): 5'-TCGACAAGGGCCCTTAACATATGCCTTAAC-3'

### **Ins-pGL3-Ins**

Das Reporterplasmid Ins-pGL3-Ins wurde hergestellt, indem eine zusätzliche doppelte Kopie des 5'-HS4 Insulators als BamHI-SalI-Fragment in die BamHI-SalI-Schnittstellen des Vektors Ins-pGL3 kloniert wurde.

### **HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins**

Die Reporterplasmide HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins wurden hergestellt, indem überlappende Fragmente aus dem Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotor mit Hilfe einer PCR amplifiziert wurden. Die Amplikons wiesen am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle auf, so dass die Fragmente nach einem BamHI-BglII-Verdau in die BamHI-Schnittstelle des Vektors Ins-pGL3 kloniert werden konnte.

### Amplifikation der Xenopus HNF1 $\alpha$ -Fragmente:

- **PCR-Primer:**

1. **Zellkultur-Primerpaar\_HNF1α(1):**

Sense-Primer I (1913-1932bp): 5'-CGGGATCCCGG CAAAGCTTAACAGCTCTACT-3';  
BamHI

BamHI

Antisense-Primer II (2715-2734bp): 5'-GAAGATCT BglII GACTGACTATACATGAAGAG-3';

BglII

Amplikon: 821bp

## 2. Zellkultur-Primerpaar\_HNF1α(2):

Sense-Primer I (2611-2632bp): 5'-CGGGATCCGG TCCTGTAATTCCAATCATTACA-3';

Antisense-Primer II (3411-3432bp): 5'-GAAGATCT **ACTGCAACACACAGAAATTATC**-3';

Amplikon: 821bp

### 3. Zellkultur-Primerpaar\_HNF1 $\alpha$ (3):

Sense-Primer I (3309-3331bp): 5'-CGGGATCCGG TGTTCAGCATAGAAACAAAGTT-3';

Antisense-Primer II (4211-4230bp): 5'-GAAGATCT CGAAGTCGAAGGATTGTACT-3';

Amplikon: 921bp

#### 4. Zellkultur-Primerpaar\_HNF1 $\alpha$ (4):

Sense-Primer I (3719-3740bp): 5'-CGGGATCCGG GTGTACAAGCAAAATACACAC-3';

Antisense-Primer II (4521-4539bp): 5'-GAAGATCT **CCTTCGAATCGAACGATTC**-3'; Amplikon:

820bp

**5. Zellkultur-Primerpaar\_HNF1 $\alpha$ (5):**

Sense-Primer I (4411-4430bp): 5'-CGGGATCCGG **TAACATTGGCCTCGGTAGGT**-3';

Antisense-Primer II (5209-5232bp): 5'-GAAGATCT **GATACAACTGTAATTCTTATGTG**-3';

Amplikon: 821bp

6. **Zellkultur-Primerpaar\_HNF1 $\alpha$ (6):**

Sense-Primer I (5111-5131bp): 5'-CGGGATCCGG **ACAAAAAGATGTC**ACTGGGGA-3';

Antisense-Primer II (5671-5690bp): 5'-GAAGATCT **TTTGGACCCCACAAAGTGCA**-3';

Amplikon: 579bp

Restriktionsenzym-spezifische Erkennungssequenzen (BamHI, BglII) sind angegeben.

- **Reaktionsansatz:**

10µl Template (~50ng); 1µl Primer I (25pmol/µl); 1µl Primer II (25pmol/µl); 1µl dNTPs (10mM); 5µl 10x Puffer; 1µl PWO-Polymerase; 31µl H<sub>2</sub>O

- **Amplifizierungsprotokoll:**

94°C für 2 Minuten; 25 x (94°C für 45 Sekunden, 60°C für 1 Minute, 72°C für 1 Minute); 72°C für 10 Minuten

**(-5949/-58)HNF1 $\alpha$ luc, (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ luc bzw. (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ luc**

Die Reporterplasmide wurden hergestellt, indem die GFP-Kassette der Reporterplasmide (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP, (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP bzw. (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP über die BamHI-XbaI-Schnittstellen aus den Vektoren entfernt und durch eine Luciferase-Kassette, welche über die BglII-XbaI-Schnittstellen aus dem pGL3-Enhancer isoliert wurde, ersetzt wurde.

**pGL3(-5949/-58)HNF1 $\alpha$ luc, pGL3(-2589/-58)HNF1 $\alpha$ luc, pGL3(-2269/-58)HNF1 $\alpha$ luc**

Die Reporterplasmide wurden hergestellt, indem die entsprechenden HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente zusammen mit dem Luciferasegen über einen XbaI-SmaI-Verdau aus den Plasmiden (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ luc, (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ luc bzw. (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ luc isoliert wurden und über die XbaI-SmaI-Schnittstellen in den Vektor pGL3-Promotor kloniert wurden.

**pGL3(-594/-58)HNF1 $\alpha$ luc**

Mit Hilfe einer PCR konnte ein Fragment des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors amplifiziert werden, welches den Bereich von -594bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst. Das Amplikon wies am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle auf, so dass das Amplikon nach einem BamHI-BglII-Verdau als BamHI-BglII-Fragment in die BglII-Schnittstelle des pGL3-Basic kloniert werden konnte. Die verwendeten Primer, der Reaktionsansatz und das Amplifizierungsprotokoll sind oben aufgeführt.

## **2.5 HALTUNG UND *IN VITRO* BEFRUCHTUNG VON *XENOPUS LAEVIS* LARVEN**

### **2.5.1 VERSUCHSTIERE**

Die als Versuchstiere verwendeten südafrikanischen Krallenfrösche *Xenopus laevis* wurden von den Firmen Xenopus I (Ann Arbor, USA) und Nasco (Ft. Atkinson, USA) erworben. Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gehalten und behandelt.

### 2.5.2 *IN VITRO* BEFRUCHTUNG VON *XENOPUS LAEVIS* EIERN

Geschlechtsreifen *Xenopus laevis* Weibchen wurden je nach Größe 500-800U humanes Choriongonadotropin (hCG) (Pregnesin, Serono Pharma GmbH, Unterschleißheim) subkutan in den dorsalen Lymphsack injiziert. Die *Xenopus* Weibchen wurden nach der Injektion bei Raumtemperatur gehalten. Etwa 12-16 Stunden nach der Injektion begann die Eiablage. Die Eier wurden durch leichte Massage oder sanften Druck des Hinterleibes gewonnen. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorganges ließen sich in zeitlich kurzen Abständen mehrere Ablagen eines Weibchens erhalten.

Zur Befruchtung der Eier wurde einem geschlechtsreifen *Xenopus laevis* Männchen nach einer 20-minütigen Betäubung mit 0,1% 3-Aminobenzoessäureethylester (Sigma, München) die Hoden entnommen. Die Hoden wurden auf einem in Holtfreter-Lösung getränkten Filterpapier bei 4°C etwa eine Woche lang aufbewahrt und konnten für mehrere *in vitro* Befruchtungen verwendet werden. Zur *in vitro* Befruchtung wurde ein kleines Stück des Hodens sorgfältig über die Eiablage gestreift. 5-10 Minuten nach der Befruchtung wurden die Eier mit 0,1x MMR überschichtet. Die kortikale Rotation als Zeichen der erfolgreichen Befruchtung konnte nach etwa 30 Minuten beobachtet werden. Wenn die Qualität der Eier gut und die Befruchtung der Eier erfolgreich war, erfolgte die kortikale Rotation bei etwa 90% der Eiablage. Die Kontrolllarven wurden bis zu ihrer Verwendung bei 18°C im Brutschrank gehalten. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber bestimmt (Nieuwkoop and Faber, 1975).

- **Holtfreter-Lösung:** 60mM NaCl; 0,6mM KCl; 0,9mM CaCl<sub>2</sub>; 2,5mM NaHCO<sub>3</sub>
- **MMR-Lösung (10x):** 1M NaCl; 20mM KCl; 10mM MgSO<sub>4</sub>; 20mM CaCl<sub>2</sub>; 50mM HEPES (pH 7,8); 1mM EDTA

### 2.5.3 FIXIERUNG VON *XENOPUS LAEVIS* LARVEN

Zur Fixierung der Larven wurden die Tiere in 5ml Schraubdeckelglasröhrchen auf einer Wippe für eine Stunde in 1x MEMFA fixiert und in 100% Methanol dehydriert, bevor sie in 100% Methanol bei -20°C gelagert werden konnten.

- **MEMFA:** 0,1M MOPS (pH 7,4); 2mM EGTA; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 3,7 % Formaldehydlösung

## 2.6 TRANSGENE *XENOPUS LAEVIS* LARVEN

### 2.6.1 SPERMIENKERNPRÄPARATION

Die Präparation der Spermienkerne erfolgte nach dem Protokoll von Kroll und Amaya (1996). Für die Permeabilisierung der Spermien wurden 50µl Digitonin (100µg/ml) anstelle von Lysolecithin verwendet (Huang et al., 1999). Die Spermienkerne wurden in 200µl Glycerolpuffer resuspendiert und gezählt (150-200 Kerne/nl). Danach wurden die Kerne entweder direkt zur Herstellung von Transgenen verwendet oder aliquotiert (je 25µl) und bei -80°C aufbewahrt. Je nach Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut, die Kerne wurden erneut gezählt und mit Glycerolpuffer auf eine Konzentration von 100 Kerne/nl verdünnt.

- **Glycerolpuffer:** 250mM Sucrose; 15mM HEPES (pH 7,7); 1mM EDTA (pH 8,0); 0,5mM Spermidin; 0,2mM Spermin; 1mM DTT; 0,3% BSA; 30% Glycerol

### 2.6.2 HERSTELLUNG TRANSGENER *XENOPUS LAEVIS*

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* wurden die Reporterplasmide mit NotI restringiert. Die NotI-Fragmente, welche die Reporter-DNA enthielten, wurden entweder direkt mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt oder über ein Agarosegel aufgetrennt, aus dem das entsprechende Fragment ausgeschnitten und mit dem „QIAEXII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) in H<sub>2</sub>O isoliert werden konnte. Der DNA-Gehalt wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt, die DNA wurde auf eine Konzentration von 0,1-0,2µg/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Um die Gallerthülle, welche die Eier umgibt, zu entfernen, wurden die unbefruchteten Eier für 1-2 Minuten in frisch angesetzter 2%-iger Cystein-Hydrochlorid-Lösung, pH 8,0 (Fluka, Neu-Ulm) geschwenkt und anschließend mehrfach mit 1x MMR gewaschen. Die Injektion erfolgte in Agaroseschalen, die mit 2,5%-iger Agarose ausgekleidet waren und zahlreiche Vertiefungen enthielten, durch welche die Eier beim Injizieren fixiert waren. Die Agaroseschalen enthielten 0,1x MMR mit 6% Ficoll. Ficoll verhindert ein Auslaufen der Embryonen beim Injizieren und fördert die Wundheilung.

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* Larven wurden 4µl gefrorene Spermienkerne (100 Kerne/nl) mit 2,5-5µl NotI-restringierter DNA (0,1-0,2µg/µl) bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ein Gemisch aus 22,5µl SDB Puffer, 2µl 100mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5U Restriktionsenzym NotI hinzugegeben. Die Suspension wurde gleichmäßig



gemischt und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Spermienkerne leicht zerbrechen können, wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet und die Bildung von Luftblasen sorgfältig vermieden. Von diesem Spermienkern/DNA Gemisch wurden 3µl mit 330µl SDB Puffer verdünnt und mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 10nl/Sekunde in unbefruchtete enthüllte *Xenopus laevis* Eier injiziert. Die Injektion erfolgte mit 100µl Glaskapillaren (BLAUBRAND intraMARK; BRAND, Wertheim/Main), deren Spitzen mit einem elektronisch gesteuerten Elektroden-Ziehgerät gezogen wurden. Der Spitzendurchmesser der Injektionsnadeln wurde manuell mit einer Pinzette auf 80-100µm eingestellt.

Nach der Injektion wurden die Eier in einem Brutschrank bei 14°C inkubiert. Nach etwa 12-14 Stunden wurden die Eier, die sich normal geteilt haben, aussortiert und in 0,1x MMR bei 18°C weiterkultiviert.

- **Sperm Dilution Buffer (SDB):** 250mM Sucrose; 75mM KCl; 0,5mM Spermidin; 0,2mM Spermin (pH 7,3-7,5)

### 2.6.3 MIKROSKOPIE

Die Larven wurden mit dem Leica MZ/FLIII Stereomikroskop analysiert und mit der KAPPA Kamera PS 30C (KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen) photographiert. Um die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) unter Fluoreszenzlicht nachweisen zu können, wurde ein 480/510nm Filterset verwendet. Bei Normallicht analysierte Larven wurden ohne Filter photographiert. Während die Verstärkung bei der Normallicht- und der Fluoreszenzaufnahme beibehalten wurde, wurde die Belichtungszeit bei der Fluoreszenzaufnahme im Vergleich zur Normallichtaufnahme (300-500ms) deutlich erhöht (11-32s). Lebende Larven wurden vor der Analyse mit 0,01% 3-Aminobenzoessäureethylester betäubt.

### 2.6.4 PCR-ANALYSE GENOMISCHER DNA

Lebenden *Xenopus laevis* Larven wurde in Stadium 59 die Schwanzspitzen abgeschnitten. Die genomische DNA wurde mit dem „DNeasy Tissue Kit“ (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers präpariert und in 200µl AE Puffer (QIAGEN) eluiert. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 10ng/µl verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Um in der genomischen DNA transgener Larven mittels PCR den GFP-Reporter nachweisen zu können, wurde das nachfolgend aufgeführte Primerpaar verwendet:

- **GFP1/2:** Sense-Primer: 5'-CCATGGCCAACACTTGTCAC-3'; Antisense-Primer: 5'-TGCACGTATCCCTCAGGCA-3'; Amplikon: 116bp

Die Schmelztemperaturen der Primer liegen bei 60°C. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus: 1µl genomische DNA (10ng); 1µl Primer I (25pmol/µl); 1µl Primer II (25pmol/µl); 1µl dNTPs (10mM); 5µl 10x Puffer; 1µl MgCl<sub>2</sub> (25mM); 0,25µl HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN); 41,25µl H<sub>2</sub>O. Die PCR-Analysen wurden in dem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer; Norwalk, USA) als „touchdown“ PCR mit folgendem Amplifizierungsprotokoll durchgeführt: 95°C für 15 Minuten; 8 x (94°C für 30 Sekunden, 67-60°C für 30 Sekunden, 72°C für 1 Minute); 25 x (94°C für 30 Sekunden, 60°C für 30 Sekunden, 72°C für 1 Minute); 72°C für 10 Minuten. Die Annealingtemperatur im ersten Zyklus betrug 67°C und wurde in den folgenden Zyklen jeweils um 1°C/Zyklus erniedrigt, bis eine Annealing-Temperatur von 60°C erreicht war, bei der sich weitere 25 Zyklen anschlossen.

Die PCR-Produkte (20µl) wurden in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt, unter UV-detektiert und photographiert.

## 2.6.5 RT-PCR VON *XENOPUS LAEVIS* GEWEBEN

Injizierte und nicht-injizierte Larven wurden mit 3-Aminobenzoesäureethylester betäubt, verschiedene Gewebe (Mesonephros, Darm, Leber, Pankreas, Gehirn, Muskel) wurden isoliert und in RNAlater (Huntingdon, Cambridgeshire, UK) bei 4°C für maximal eine Woche aufbewahrt.

Die Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy Tissue Kit“ (QIAGEN) präpariert. Die verschiedenen Gewebe wurden in 600µl RLT-Puffer (QIAGEN) resuspendiert und über „QIAshredder“-Säulen (QIAGEN) homogenisiert. Desweiteren wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, die Proben wurden mit RNase-freier DNaseI (QIAGEN) behandelt und in 30µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

Für die Reverse Transkription (RT) wurde die QIAGEN Omniscript Reverse Transcriptase verwendet, die für eine Menge von 50ng bis 2µg RNA optimiert ist. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus: 1µg RNA-Template; 1µl Random Primer; 2µl dNTPs (10mM); 0,25µl RNase-Inhibitor (RNaseOut; Invitrogen); 2µl 10x Reaktionspuffer;

1µl Omniscript; entsprechende Menge RNase-freies H<sub>2</sub>O. Um DNA-Kontaminationen ausschließen zu können, wurde stets ein Ansatz ohne Omniscript durchgeführt. Die 20µl-Ansätze wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und direkt für die nachfolgende PCR eingesetzt oder bei –20°C gelagert.

Für die PCR wurden die folgenden Primerpaare verwendet:

- **GFP1/2:** Sense-Primer: 5'-CCATGGCCAACACTTGTCAC-3'; Antisense-Primer: 5'-TGCACGTATCCCTCAGGCA-3'; Amplikon: 116bp; Annealing-Temperatur T<sub>M</sub>: 60°C
- **ODC1/2:** Sense-Primer: 5'-AATGGATTTCAGAGACCA-3'; Antisense-Primer: 5'-CCAAGGCTAAAGTTGCAG-3'; Amplikon: 234bp; Annealing-Temperatur T<sub>M</sub>: 44°C
- **xHNF1α1/2:** Sense-Primer: 5'-CCTGAAGAGGCTGCTCATCAG-3'; Antisense-Primer: 5'-GTCCTGCATGTGTGAACTCTG-3'; Amplikon: 280bp; Annealing-Temperatur T<sub>M</sub>: 54°C

Ein typischer Reaktionsansatz (50µl) für die PCR sah folgendermaßen aus: 3-7µl RT<sup>+</sup>/RT<sup>-</sup>-Ansatz; 1µl Primer I (25pmol/µl); 1µl Primer II (25pmol/µl); 1µl dNTPs (10mM); 5µl 10x Puffer; 2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM); 0,3µl Goldstar Taq DNA Polymerase (Eurogentec, Köln); entsprechende Menge H<sub>2</sub>O. Die PCR-Analysen wurden mit folgendem Amplifizierungsprotokoll durchgeführt: 94°C für 2 Minuten; 25-35 x (94°C für 45 Sekunden, Annealing-Temperatur T<sub>M</sub> für 1 Minute, 72°C für 90 Sekunden); 72°C für 7 Minuten. Die Annealing-Temperatur wurde den jeweiligen Primerpaaren angepaßt. Die PCR-Produkte (20µl) wurden in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht detektiert und photographiert.

## 2.7 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.7.1 ZELLINIEN

Für die Untersuchungen wurden Zelllinien unterschiedlicher Herkunft verwendet. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine Cervixkarzinomzelllinie des Menschen. HEK293 stellt eine immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen dar. Bei FT02B-Zellen handelt es sich um eine Leberkarzinomzelllinie der Ratte.

### 2.7.2 KULTIVIERUNG VON HELa-, HEK293- UND FT02B-ZELLEN

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in nach Dulbecco modifiziertem Eagles Medium (DMEM), welches mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Fötales Kälberserum), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin komplementiert wurde (DMEM<sup>3+</sup>). Die Inkubation der Zellen erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre (95%) bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub>.

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden 10<sup>7</sup> Zellen in 3ml kaltem Einfriermedium (DMEM komplementiert mit 20% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% DMSO) aufgenommen, in 1ml Aliquots langsam auf -80°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung der Zellen wurden die Aliquots auf 37°C erwärmt und in 10ml vorgewärmtes Medium in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

### 2.7.3 TRANSFEKTION MIT LIPOFECTAMINE<sup>TM</sup>

Lipofectamine<sup>TM</sup> (Life Technologies, Karlsruhe) besteht aus einem polykationischen Lipid und einem neutralen Lipid im Verhältnis 3:1 (w/w) in H<sub>2</sub>O. Dieses Gemisch bildet Liposomen aus, die sich mit der DNA zu stabilen Komplexen zusammenlagern und diese durch Fusion mit der Zellmembran in das Zellinnere befördern können.

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen passagiert und in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von 3x10<sup>5</sup> Zellen/Loch ausgesät. 1,3µg Reporterplasmid wurde mit serumfreiem Medium (Optimem, Invitrogen) in einem Gesamtvolumen von 100µl verdünnt. Die Transfektion erfolgte in 6-Loch-Platten mit 6µl Lipofectamine<sup>TM</sup> nach den Angaben des Herstellers. Es wurden immer mindestens drei Löcher pro Reporterplasmid identisch behandelt (Dreifachbestimmung). Die Zellen wurden zweimal mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freier PBS-Lösung (PBS<sup>2-</sup>) gewaschen und mit serumfreiem Medium inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Liposomen-DNA-Mischung zugegeben. Die Transfektion fand für 4 Stunden im Brutschrank statt. Nach dieser Zeit wurde das Transfektionsgemisch von den Zellen abgesaugt und gegen serumhaltiges Medium (DMEM<sup>3+</sup>) ersetzt.

- **PBS<sup>2-</sup>**: 137mM NaCl; 2,6mM KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2 bis 7,4)

### 2.7.4 LUCIFERASE-ASSAY

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit PBS<sup>2-</sup> gewaschen, in 500µl Lysepuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Gummispatels von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 10.000rpm zentrifugiert, von dem Überstand wurden 20µl mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

- **Lysepuffer:** 25mM Triphosphat (pH 7,8), 2mM DTT, 2mM CDTA, 1% Triton-X-100

## 2.8 GELRETARDATIONSANALYSE (BANDSHIFT)

### 2.8.1 ANNEALING KOMPLEMENTÄRER DNA-EINZELSTRÄNGEN

Da Transkriptionsfaktoren in der Regel an doppelsträngige DNA binden, synthetisch jedoch nur Einzelstrang-DNA hergestellt werden kann, ist eine Anlagerung (Annealing) von zwei komplementären DNA-Strängen erforderlich, um eine intakte Bindestelle zu erhalten.

Für die Annealing-Reaktion wurden jeweils 50ng der komplementären Oligonukleotide FII-F und FII-R mit 10µl 10x PolI-Puffer und 27,5µl H<sub>2</sub>O zusammengegeben und in einem Heizblock 2 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (nicht schneller als 1°C pro Minute) und bei 4°C gelagert.

- **PolI-Puffer:** 70mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 70mM MgCl<sub>2</sub> ; 500mM NaCl

#### Synthetisches Oligonukleotid FII:

Das FII-Oligonukleotid beinhaltet die CTCF-Bindestelle des bekannten Vertebraten-Insulators 5'-HS4 aus dem β-Globin-Gencluster des Huhns (Bell et al., 1999).

5' -AGCTCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCGCTAGGGGGCAGCA-3'  
3' -GGGTCCCTACATTAATGCAGGGAGGGGCGATCCCCGTCGTCTAG-5'

Um eine radioaktive Markierung dieser Oligonukleotide zu ermöglichen, weist jedes Oligonukleotid am 5'-Ende überhängende Nukleotide auf.

### 2.8.2 RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER DNA-SONDE FII

Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des „Klenow-Fragmentes“ einer DNA-Polymerase aus *E. coli*, welches zwar noch über deren 5'-3'-DNA-Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt, im Gegensatz zum Holoenzym jedoch keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität aufweist (Ausubel et al., 1989). Durch die Zugabe eines radioaktiv markierten Nukleotids ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP; 9,25MBq, 250 $\mu\text{Ci}$ ; ICN, Eschwege) zu dem Reaktionsansatz wurden die 5'-überhängenden Enden der Oligonukleotide aufgefüllt und mit  $^{32}\text{P}$  markiert. Ein typischer Markierungsansatz sah folgendermaßen aus: 20ng doppelsträngige Oligonukleotide; 2 $\mu\text{l}$  10mM Dithiothreitol (DTT); 3 $\mu\text{l}$  3,3mM dATP, dTTP, dGTP; 4 $\mu\text{l}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP; 3,8 $\mu\text{l}$  Klenow (2U/ $\mu\text{l}$ ).

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurden die überhängenden Enden aufgrund der 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität aufgefüllt, so dass „blunt ends“ entstanden. Der Ansatz wurde mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN) aufgereinigt und in 50 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Die radioaktiv markierten Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.8.3 GEKOPPELTE *IN VITRO* TRANSKRIPTION/TRANSLATION

Zur Synthese der Proteine CTCF und HNF1 $\beta$  wurde eine gekoppelte Transkription/Translation (TNT) im Kaninchen-Reticulocytenlysat (TNT<sup>(R)</sup> T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate Systems; Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein typischer Ansatz sah folgendermaßen aus: 9 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ; 1 $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer; 1 $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); 0,5 $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (RNaseOut; Invitrogen); 0,5 $\mu\text{l}$  Aminosäure-Mix ohne Methionin (1mM); 0,5 $\mu\text{l}$  Aminosäure-Mix ohne Leucin (1mM); 12,5 $\mu\text{l}$  Reticulocyten-Lysat; 0,5 $\mu\text{l}$  RNA-Polymerase. Die Synthese fand unter Verwendung der RNA-Polymerasen T3 (CTCF) oder T7 (HNF1 $\beta$ ) statt. Der 25 $\mu\text{l}$  Ansatz wurde für 90 Minuten bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Proben wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.8.4 GELRETARDATIONS-KOMPETITIONS-ASSAYS, PHOSPHORIMAGER

Potentielle CTCF-Bindestellen im *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotor wurden indirekt anhand von Konkurrenzexperimenten nachgewiesen. Die zur Herstellung der transgenen *Xenopus laevis* Larven konstruierten HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte (-5949/-58; -3932/-58; -2589/-58; -2269/-58; -594/-58) wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, einen spezifischen CTCF-

DNA-Komplex zu kompetieren. Die Gelretardationsanalysen wurden mit synthetisch hergestellten Proteinen durchgeführt (siehe 2.8.3). Der Reaktionsansatz enthielt neben 3-5µl CTCF-TNT aufsteigende Konzentrationen von nicht markierten HNF1αGFP Promotorkonstrukten als Kompetitoren (30ng, 150ng, 300ng). Nach einer ersten Inkubationsphase eines 15µl Ansatzes in Reaktionspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurden  $10^4$  cpm/Ansatz (5µl Volumen in Reaktionspuffer)  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markiertes Oligonukleotid FII zugegeben und für weitere 15-30 Minuten inkubiert. Die entstandenen Protein/DNA-Komplexe wurden in 5%-igen Polyacrylamidgelen in 0,5x TBE-Puffer für 1,5 Stunden bei 100 Volt aufgetrennt. Um die Komplexe sichtbar zu machen, wurden die Gele getrocknet und für 12-48 Stunden mit Kodak-Röntgen-Filmen belegt.

Um die Ergebnisse der Gelretardations-Kompetitions-Assays quantitativ auswerten zu können, wurden die getrockneten Gele für 8-12 Stunden auf einer Bioimagerplatte exponiert. Die Bioimagerplatte wurde mit dem PhosphorImager Fuji Bioimager 1500 (Raytest, Straubenhardt) eingelesen und mit den entsprechenden Auswertungsprogrammen (BAS Reader 2.13, Aida 2.11) ausgewertet.

- Reaktionspuffer: in PBS: 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1mM  $\text{ZnSO}_4$ , 1mM DTT, 0,1% NP-40, 10% Glycerol
- 10x TBE (Tris-borate-EDTA): 108g Tris-HCl, 55g Borsäure, 20mM EDTA pH 8,0; ad 1 Liter  $\text{H}_2\text{O}$

### 3 ERGEBNISSE

Bei der Charakterisierung der Expression des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass das Promotorfragment (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis* Larven eine Expression sowohl in entodermalen Geweben (Darm und Leber) als auch im mesodermalen Pronephros (erste Form der Niere bei Vertebraten) auslöst. Im Gegensatz dazu ist ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) nicht ausreichend, um eine korrekte Expression des Transgens im *Xenopus* zu steuern (Ryffel and Lingott, 2000). Die für den Verlust der gewebespezifischen Genexpression verantwortlichen Regulationselemente sollten im Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

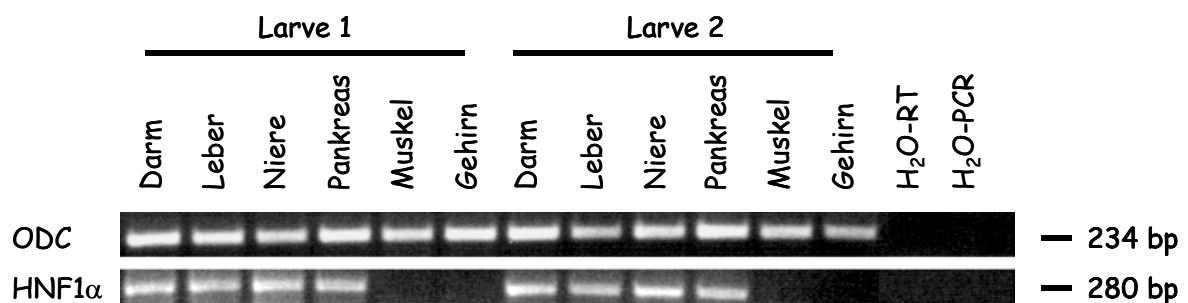
#### 3.1 HNF1 $\alpha$ WIRD IN *XENOPUS LAEVIS* LARVEN IN ENTODERMALEN UND MESODERMALEN GEWEBEN EXPRIMIERT

Amphibien bilden während der Ontogenese zwei Nierentypen: die Vorniere (Pronephros) und die Urnieren (Mesonephros). Zwei Tage nach der Befruchtung lässt sich in *Xenopus laevis* Larven (Stadium 35/36) die ursprüngliche Form der Niere bei Vertebraten finden, die als Pronephros bezeichnet wird. Sieben Tage nach der Befruchtung (Stadium 48) differenzieren die ersten Zellen des Mesonephros. Während sich der Pronephros im Laufe der Larvalentwicklung wieder zurückbildet, persistiert der Mesonephros, so dass eine freischwimmende Larve unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) schließlich nur noch den Mesonephros als endgültige Form der Niere aufweist, während der Pronephros vollkommen degeneriert ist. In höheren Vertebraten entwickelt sich der Pronephros nur noch als ein rudimentäres Organ und die erste funktionelle Nierenform im Embryo ist der Mesonephros, welcher in der weiteren Entwicklung durch den Metanephros ersetzt wird.

Das HNF1 $\alpha$  Protein wird bei Säugern in Metanephros, Leber, Magen, Darm und Pankreas exprimiert (Blumenfeld et al., 1991; De Simone et al., 1991; Baumhueter et al., 1990; Kuo et al., 1990). Auch bei *Xenopus* konnte das Protein in der frühen Embryonalentwicklung in Pronephros, Leber und Darm nachgewiesen werden (Bartkowski et al., 1993). Die Expression von HNF1 $\alpha$  im Pronephros von *Xenopus laevis* Larven konnte zwar nachgewiesen werden, es lagen jedoch keine Erkenntnisse über die Expression von HNF1 $\alpha$  im Mesonephros vor. Auch über die Expression von HNF1 $\alpha$  im Pankreas war bislang nichts bekannt.



Um Hinweise auf die Expression des endogenen HNF1 $\alpha$  Gens in diesen Geweben zu erhalten, wurde die Expression der HNF1 $\alpha$ -mRNA von freischwimmenden *Xenopus laevis* Wildtyp-Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) untersucht. Der Nachweis der HNF1 $\alpha$ -mRNA erfolgte nach Übersetzen der in den verschiedenen Geweben vorhandenen mRNAs in die entsprechenden cDNAs, welche anschließend mittels PCR amplifiziert wurden (RT-PCR). Dazu wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben entodermalen Ursprungs (Darm, Leber, Pankreas), mesodermalen Ursprungs (Mesonephros, Muskel) sowie aus dem Ektoderm entstammenden Gehirn isoliert und für eine nachfolgende cDNA-Synthese verwendet. Die sich anschließende PCR erfolgte mittels eines Primerpaares, welches zu einem spezifischen Bereich der HNF1 $\alpha$ -cDNA komplementär ist und ein Fragment von 280bp amplifiziert. Um in den RT-PCR-Reaktionen die Qualität und Menge der eingesetzten Gesamt-RNA überprüfen zu können, wurde ein Fragment des konstitutiv exprimierten Gens Ornithin-Decarboxylase (ODC) mit spezifischen Primern amplifiziert, welche ein Fragment von 234bp flankieren. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung in einem 2%-igen Agarosegel.



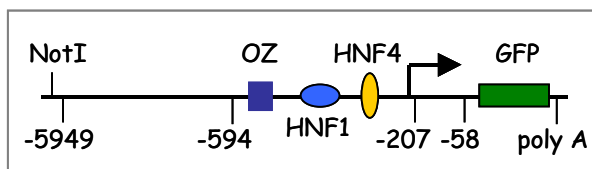
**Abbildung 2: Endogenes HNF1 $\alpha$  wird in *Xenopus laevis* Larven in Geweben entodermalen und mesodermalen Ursprungs exprimiert.** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach RT-PCR aus isolierten Geweben aus *Xenopus laevis* Wildtyp-Larven in Stadium 59. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und für eine nachfolgende cDNA-Synthese verwendet. Die sich anschließende PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein 280bp großes Fragment von HNF1 $\alpha$ . Die Qualität und Menge der eingesetzten Gesamt-RNA wurde anhand des konstitutiv exprimierten Gens ODC kontrolliert.

Die Abbildung 2 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach RT-PCR. Die Größe der HNF1 $\alpha$ -Fragmente entsprach der erwarteten Länge von 280bp. Das HNF1 $\alpha$ -Fragment ist in den entodermalen Geweben Darm, Leber und Pankreas nachweisbar, ebenso in dem sich aus dem Mesoderm entwickelnden Mesonephros. Weder in Muskelgewebe noch im Gehirn lässt sich HNF1 $\alpha$  nachweisen.

Die Untersuchungen zeigen, dass das Expressionsprofil des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  bei *Xenopus laevis* demjenigen bei Säugern entspricht. HNF1 $\alpha$  wird in Darm, Leber, Pankreas und Niere exprimiert.

### 3.2 DAS PROMOTORKONSTRUKT (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP WIRD IN ENTODERMALEN UND MESODERMALEN GEWEBEN EXPRIMIERT

Um die Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotors in transgenen *Xenopus laevis* Larven untersuchen zu können, wurde ein Fragment des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors, welches einen Bereich von -5949bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst, zur Regulierung des Reportergens GFP verwendet (Abbildung 3) und als Transgen in den Organismus integriert.



**Abbildung 3: Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen.** Die schematische Darstellung zeigt den sequenzierten Bereich von -5949bp (EcoRI-Schnittstelle) bis -58bp des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors. Die Positionen beziehen sich auf die Distanz zur Translationsstartstelle (ATG). Die Bindestellen für OZ1, HNF1 und HNF4 sowie die Transkriptionsstartstelle sind schematisch dargestellt (Zapp et al., 1993; Holewa et al., 1996). Das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment wird zur Regulierung des Reportergens GFP verwendet. Die bakterielle Plasmidsequenz, die zur Klonierung benötigt wird, ist nicht dargestellt. Die NotI-Schnittstelle dient zur Linearisierung des Promotorkonstruktes.

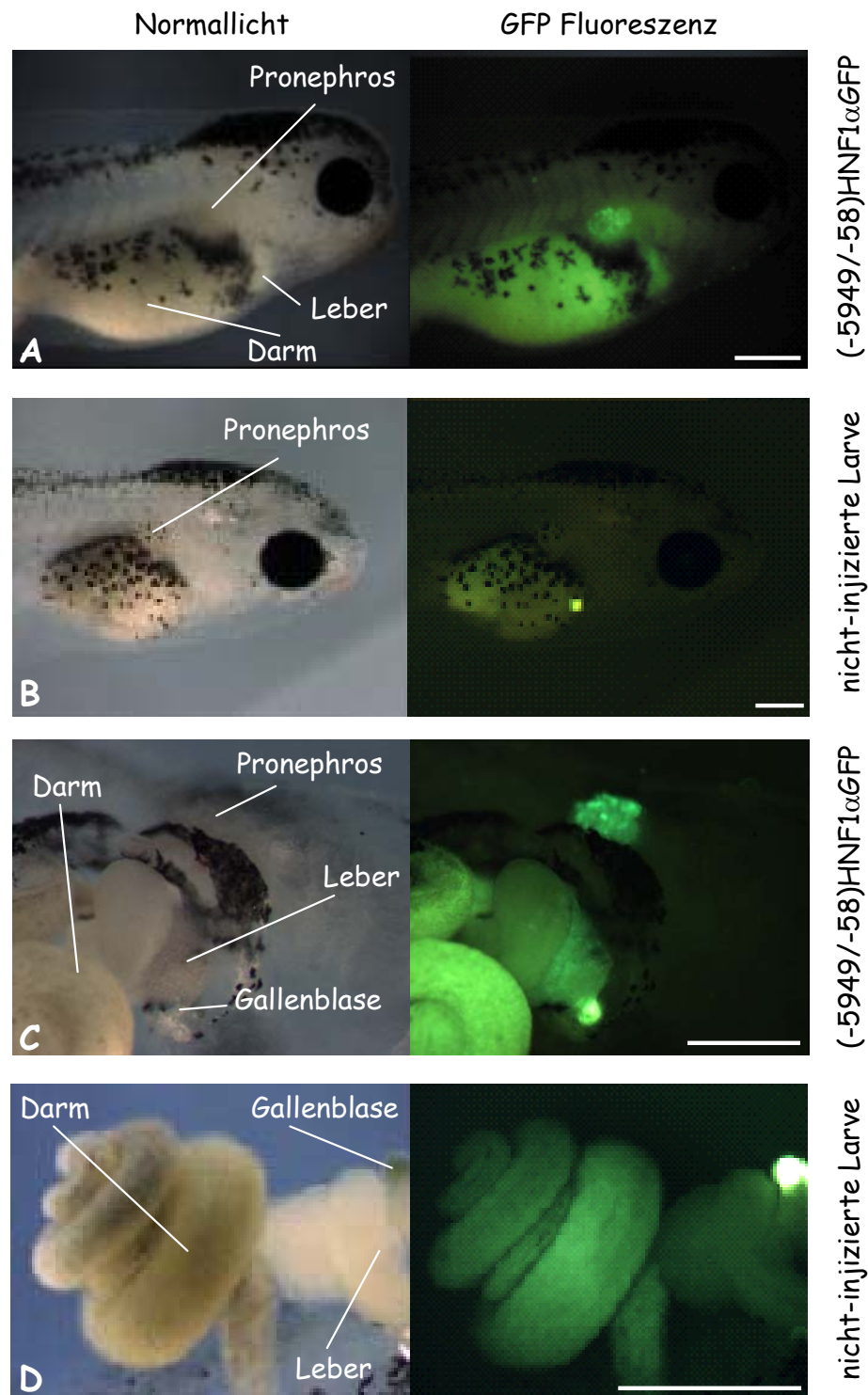
Transgene *Xenopus laevis* Larven wurden durch Restriktionsenzym-vermittelte Integration (REMI) linearisierter Plasmid-DNA in Spermienkerne und der anschließenden Transplantation dieser Kerne in unbefruchtete Eier hergestellt (Kroll and Amaya, 1996; Marsh-Armstrong et al., 1999; Sparrow et al., 2000b).

7300 unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier wurden mit Spermienkernen injiziert, welche zuvor mit linearisierter (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA inkubiert wurden. 924 dieser Eier zeigten die typischen Furchungsschritte der frühen Embryonalentwicklung. 145 Larven wiesen eine klare Kopf-Schwanz-Differenzierung auf und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich einer GFP-Fluoreszenz untersucht werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Expression des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Eine mesodermale Expression repräsentiert eine GFP-Fluoreszenz im Pronephros. Eine entodermale Expression bezieht sich auf ein GFP-positives Signal in Darm und Leber. Transgene Larven mit Mosaikexpression weisen einzelne stark GFP-fluoreszierende Zellen auf.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)			
				$\Sigma$	Meso-dermal	Ento-dermal	Mosaik
<b>(-5949/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	7300	924	145	22	86% (19)	68% (15)	13% (3)

Die Abbildung 4A zeigt eine laterale Ansicht einer drei Tage alten *Xenopus laevis* Larve (Stadium 40), welche das Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen exprimiert, unter Normallicht (links) und unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (rechts). Mit dem Filterset zur Detektion von GFP lässt sich die grüne Fluoreszenz des Reportergens im Pronephros detektieren. Im Gegensatz zu der eindeutigen GFP-Fluoreszenz im Pronephros ist die GFP-Fluoreszenz dieser Tiere in entodermalen Geweben wie Darm und Leber kaum von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden, die bei nicht-injizierten Kontrolllarven auftritt (Abbildung 4B). Um die GFP-Fluoreszenz entodermaler Gewebe eindeutig von dieser Autofluoreszenz unterscheiden zu können, wurden die transgenen Larven fünf Tage nach der Injektion (Stadium 45) sezirt, so dass die entodermalen Gewebe wie Darm und Leber frei lagen und direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden konnten. Die Abbildung 4C zeigt eine Detailaufnahme der inneren Organe einer sezirten Larve. Die grüne Fluoreszenz von GFP in Leber und Darm ist klar erkennbar und eindeutig von der Autofluoreszenz entodermaler Gewebe einer nicht-injizierten Kontrolllarve (Abbildung 4D) zu unterscheiden. Auch die GFP-Fluoreszenz des Pronephros lässt sich in diesem Stadium detektieren (Abbildung 4C). Die starke Fluoreszenz der Gallenblase ist nicht auf die Expression von GFP, sondern auf die starke Autofluoreszenz des Organs zurückzuführen.



**Abbildung 4: (A) und (C) Expression des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1αGFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Das NotI-linearisierte Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1αGFP wurde als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier injiziert. **(B) und (D) Autofluoreszenz einer nicht-injizierten *Xenopus laevis* Larve in entodermalen Geweben.** Die gezeigte *Xenopus* Larve entwickelte sich aus einem Ei, das mit Wildtyp-Spermien befruchtet wurde.

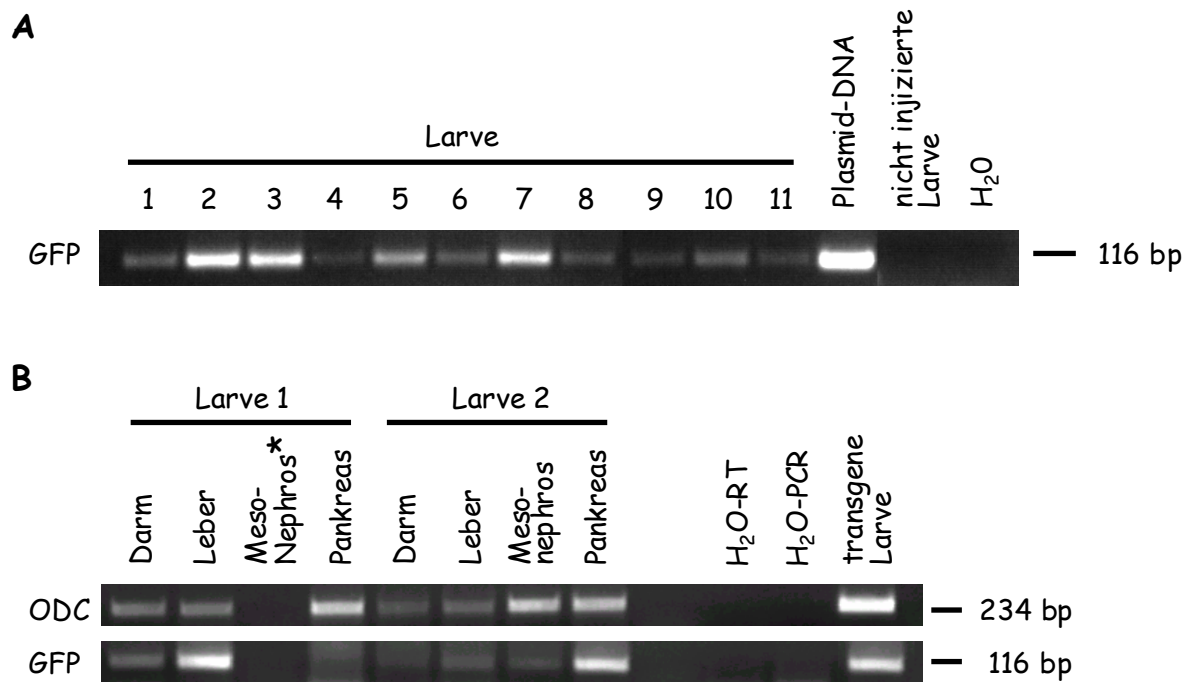
Die Larven wurden mit dem Leica MZ/FLIII Stereomikroskop analysiert und mit der KAPPA Kamera PS 30C photographiert. Die Larven wurden unter Normallicht (links) sowie unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (rechts) photographiert. Bei Normallicht analysierte Larven wurden ohne Filter photographiert. Während die Verstärkung bei der Normallicht- und der Fluoreszenzaufnahme beibehalten wurde, wurde die Belichtungszeit bei der Fluoreszenzaufnahme im Vergleich zur Normallichtaufnahme (300-500ms) deutlich erhöht (11-32s). Der Größenmaßstab entspricht 250µm.

**(A) und (B)** Laterale Ansicht einer lebenden Larve in Stadium 40. **(C) und (D)** Detailaufnahme der inneren Organe einer seziierten Larve in Stadium 45.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist in Tabelle 1 aufgeführt. Insgesamt ließ sich bei 22 Larven, bei denen Kopf und Schwanz eindeutig identifizierbar waren, eine Expression von GFP detektieren. Auch Larven, bei denen die Reporter-DNA nur auf einer Seite der dorsoventralen Körperachse exprimiert wird, wurden in die Auswertung einbezogen. Eine mögliche Erklärung für dieses rechts-links-chimäre Expressionsmuster ist, dass die exogene DNA erst nach der DNA-Replikation des ersten Zellzyklus stabil in das Genom integriert wurde. 19 (86%) der transgenen Larven wiesen eine mesodermale GFP-Fluoreszenz im Pronephros auf. Bei 15 (68%) dieser Larven konnte zusätzlich eine Expression von GFP in den entodermalen Geweben Darm und Leber detektiert werden. Bei keiner der transgenen Larven ließ sich eine GFP-Fluoreszenz im Pankreas beobachten. Die gewebespezifische Expression des Transgens deutet darauf hin, dass die Reporter-DNA unter der Kontrolle des HNF1 $\alpha$  Promotors exprimiert wird. Bei drei transgenen Larven war die Expression von GFP auf einzelne Zellen beschränkt, die stark fluoreszierten (Mosaikexpression). Neben dieser Mosaikexpression zeigten die Larven kein gewebespezifisches Expressionsmuster.

Um zu überprüfen, ob die unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer GFP-Fluoreszenz identifizierten transgenen Larven das Transgen aufweisen, wurde einigen Larven etwa vier bis fünf Wochen später, unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59), die Schwanzspitze abgeschnitten und die genomische DNA extrahiert. Um in der genomischen DNA dieser Larven mittels PCR den GFP-Reporter nachweisen zu können, wurde ein Primerpaar verwendet, welches zu einem spezifischen Bereich der GFP-cDNA komplementär ist und ein Fragment von 116bp amplifiziert.

Die Abbildung 5A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die Größe der GFP-Fragmente war in allen Proben identisch und entsprach der erwarteten Länge von 116bp. In der genomischen DNA der elf untersuchten Larven lässt sich das GFP-Reportergen detektieren. Obwohl gleiche Mengen an genomischer DNA in die PCR eingesetzt wurden, können starke Unterschiede in der Intensität der einzelnen Banden beobachtet werden. Erwartungsgemäß kann in einer nicht-injizierten Kontrolllarve (Negativkontrolle) kein GFP nachgewiesen werden.



**Abbildung 5: Expression des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.**

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze von *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein Fragment des Reportergens GFP. Als Positivkontrolle wurde ein GFP-Fragment aus (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA amplifiziert. Als Negativkontrolle diente genomische DNA einer nicht-injizierten Kontrolllarve. Die Qualität der PCR wurde anhand der H<sub>2</sub>O-Kontrolle überprüft.

(B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach RT-PCR aus isolierten Geweben transgener *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und für eine nachfolgende cDNA-Synthese verwendet. Die anschließende PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein Fragment des Reportergens GFP. Die Qualität und Menge der eingesetzten Gesamt-RNA wurde anhand des konstitutiv exprimierten Gens ODC kontrolliert. Als Positivkontrolle diente RNA einer transgenen Larve.

\* Reverse Transkription (RT) war nicht erfolgreich, da zu wenig RNA isoliert wurde.

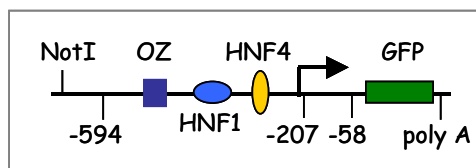
Die Analyse der Expression des Transgens von Larven in frühen Entwicklungsstadien unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab, dass der GFP-Reporter sowohl im mesodermalen Pronephros als auch in den entodermalen Geweben Darm und Leber exprimiert wird. Mittels RT-PCR wurde das Expressionsmuster des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP dieser Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) analysiert. Es sollte insbesondere untersucht werden, ob sich der GFP-Reporter ebenso wie im Pronephros auch im später vorliegenden Mesonephros detektieren lässt.

Für diese Experimente wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben entodermalen Ursprungs (Darm, Leber, Pankreas) und dem aus dem Mesoderm entstammenden Mesonephros isoliert und für eine nachfolgende cDNA-Synthese verwendet. Die anschließende PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein 116bp langes Fragment von GFP.

Die Abbildung 5B zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach RT-PCR. Der GFP-Reporter kann im Mesonephros nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den entodermalen Geweben Darm und Leber lässt sich auch im Pankreas ein GFP-positives Signal detektieren. Dieses Expressionsprofil entspricht demjenigen des endogenen HNF1 $\alpha$  Gens.

### 3.3 DIE EXPRESSION DES KURZEN PROMOTORKONSTRUKTES (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP IST AUF DIE NIERE BESCHRÄNKT UND FÜHRT ZU MOSAIKEXPRESSION

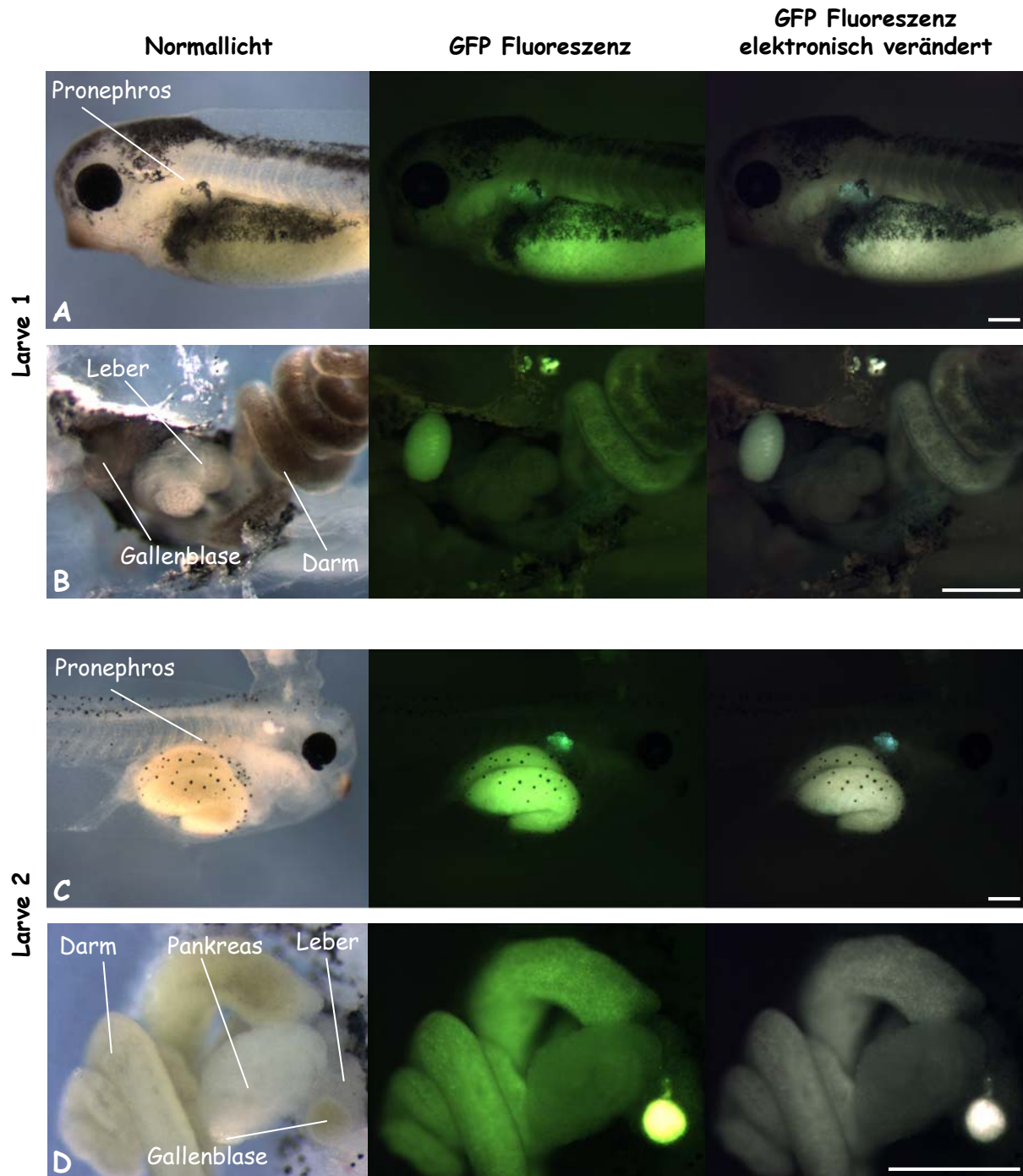
Um zu überprüfen, ob auch ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment, welches einen Bereich von -594bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst, ausreichend ist, um eine gewebespezifische HNF1 $\alpha$ -Expression zu steuern, wurde dieses Fragment mit dem GFP-Reportergen fusioniert (Abbildung 6) und als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier transplantiert.



**Abbildung 6: Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen.** Die schematische Darstellung zeigt den Bereich von -594bp bis -58bp des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors. Die Bindestellen für OZ1, HNF1 und HNF4 sowie die Transkriptionsstartstelle sind dargestellt. Das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment wird zur Regulierung des Reportergens GFP verwendet. Die bakterielle Plasmidsequenz, die zur Klonierung benötigt wird, ist nicht dargestellt. Die NotI-Schnittstelle dient zur Linearisierung des Promotorkonstruktes.

Die Abbildung 7A zeigt eine transgene Larve drei Tage nach der Befruchtung (Stadium 40), an der mit dem Filterset zur Detektion von GFP eine grüne Fluoreszenz im Pronephros sichtbar ist. Um diese GFP gesteuerte Expression deutlicher von der Hintergrundfluoreszenz unterscheiden zu können, wurde das Signal mit dem Computer elektronisch verändert, so dass die GFP-positiven Gewebe bläulich und die Hintergrundfluoreszenz weiß erscheinen. Während die elektronisch veränderte GFP-Fluoreszenz im Pronephros eindeutig bläulich erscheint, wirken die entodermalen Gewebe Darm und Leber weiß.





**Abbildung 7: Expression des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Das NotI-linearisierte Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP wurde als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier injiziert. Die Larven wurden mit dem Leica MZ/FLIII Stereomikroskop analysiert und mit der KAPPA Kamera PS 30C photographiert. Die Larven wurden unter Normallicht (links) sowie unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (Mitte und rechts) photographiert. Das rechte GFP-Signal wurde elektronisch mit dem Computer verändert (siehe Text). Bei Normallicht analysierte Larven wurden ohne Filter photographiert. Der Größenmaßstab entspricht 250 $\mu$ m. **(A) und (B)** repräsentieren die Aufnahmen einer transgenen Larve, in **(C) und (D)** sind die Aufnahmen einer weiteren transgenen Larve dargestellt. **(A) und (C)** Laterale Ansicht einer lebenden Larve in Stadium 40. **(B) und (D)** Detailaufnahme der inneren Organe einer seziierten Larve in Stadium 45.



Um die entodermalen Gewebe besser analysieren zu können, wurde dieselbe Larve zwei Tage später (Stadium 45) seziiert. Die Abbildung 7B zeigt eine Detailaufnahme der inneren Organe unter Normallicht (links) und unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (Mitte bzw. elektronisch verändert rechts). Weder im Darm noch in der Leber lässt sich ein GFP-positives Signal detektieren.

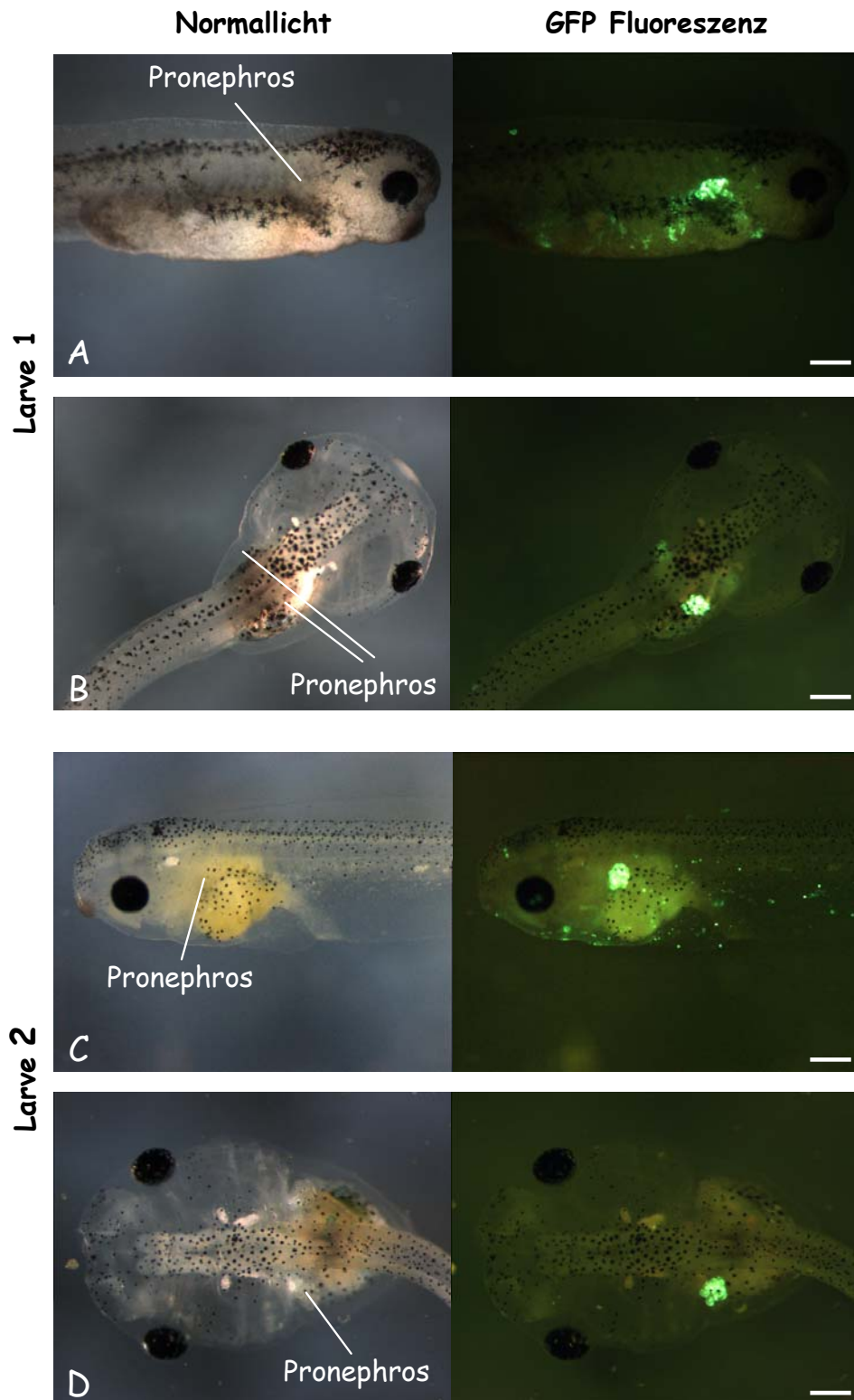
In den Abbildungen 7C und 7D ist ein weiteres Beispiel einer Larve aufgeführt, welche das Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen exprimiert. Das Expressionsmuster ist identisch zu dem oben beschriebenen Beispiel (Abbildungen 7A und 7B). GFP lässt sich ausschließlich im Pronephros detektieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von 169 unter dem Fluoreszenzmikroskop analysierten Larven, bei denen Kopf und Schwanz eindeutig identifizierbar waren, 23 Larven eine Expression von GFP zeigten (Tabelle 2). Von diesen 23 Larven wiesen 18 (78%) Larven eine Expression im mesodermalen Pronephros auf. Nur bei drei (13%) transgenen Larven konnte zusätzlich eine Expression von GFP in den entodermalen Geweben Darm und Leber beobachtet werden.

**Tabelle 2: Expression des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Eine mesodermale Expression repräsentiert eine GFP-Fluoreszenz im Pronephros. Eine entodermale Expression bezieht sich auf ein GFP-positives Signal in Darm und Leber. Transgene Larven mit Mosaikexpression weisen einzelne stark GFP-fluoreszierende Zellen auf.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)			
				$\Sigma$	Meso- dermal	Ento- dermal	Mosaik
<b>(-594/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	9340	1261	169	23	78% (18)	13% (3)	56% (13)

Die Expression des kurzen Promotorfragmentes ist häufig mit einer Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen assoziiert. Die Abbildungen 8A und 8C zeigen laterale Aufnahmen dieser Larven zwei (8A) bzw. drei Tage (8C) nach der Injektion. Während die in den Abbildungen 8A und 8B dargestellte Larve die Reporter-DNA auf beiden Seiten der dorsoventralen Körperachse exprimiert, lässt sich bei der in den Abbildungen 8C und 8D dargestellten Larve eine Expression der Reporter-DNA nur auf einer Seite der dorsoventralen Körperachse beobachten.



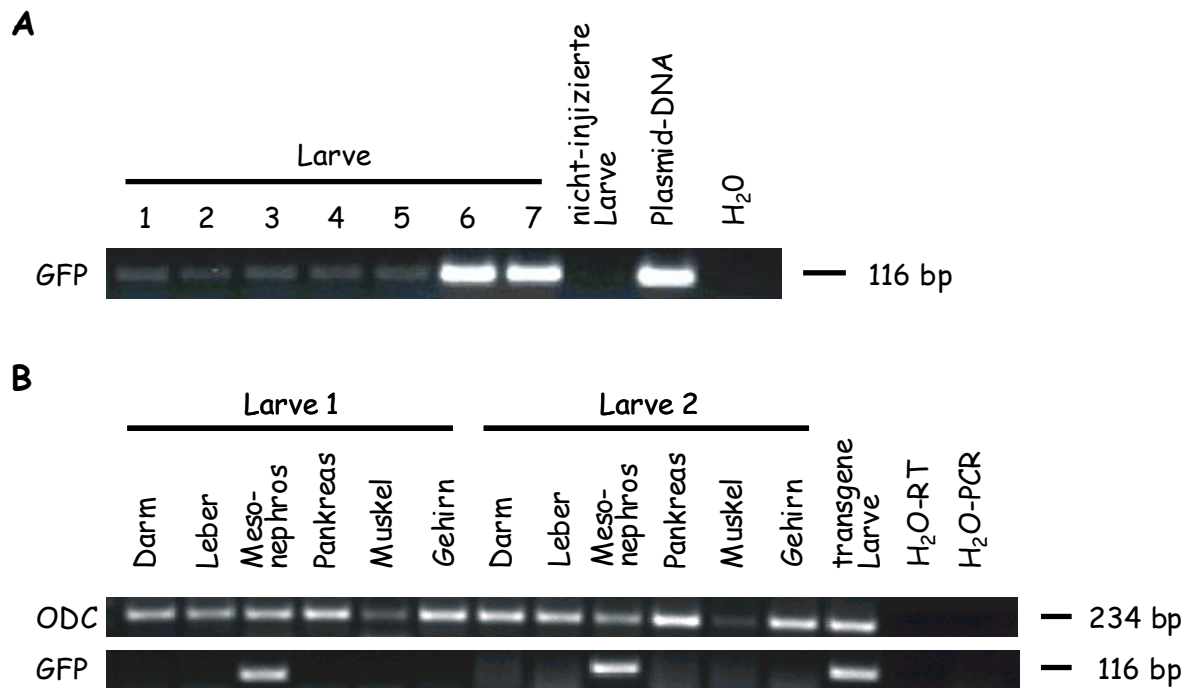
**Abbildung 8: Mosaikexpression in frühen Entwicklungsstadien transgener (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP *Xenopus laevis* Larven.** Die Abbildung zeigt zwei transgene *Xenopus* Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien [(A) Stadium 37/38, (C) Stadium 40, (B) und (D) Stadium 45]. (A) und (B) repräsentieren die Aufnahmen einer transgenen Larve, in (C) und (D) sind die Aufnahmen einer weiteren transgenen Larve dargestellt. Bei beiden Larven lässt sich in (A) und (C) eine Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen detektieren. Auf den in den Abbildungen (B) und (D) gezeigten dorsalen Aufnahmen freischwimmender Larven kann diese Mosaikexpression nicht mehr beobachtet werden. Zusätzlich zu dieser Mosaikexpression weisen diese Larven eine gewebespezifische Expression von GFP im Pronephros auf. Der Größenmaßstab entspricht 250µm. Weitere Erklärungen sind der Abbildung 7 zu entnehmen.

Neben einer mesodermalen Expression im Pronephros lässt sich bei beiden Larven eine starke Expression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen beobachten. Diese Mosaikexpression ist transient, sie kann auf den in den Abbildungen 8B und 8D gezeigten dorsalen Aufnahmen derselben Larven fünf Tage nach der Injektion (Stadium 45) nicht mehr detektiert werden. Die GFP-Fluoreszenz im Pronephros hingegen lässt sich auch hier eindeutig erkennen.

In Tabelle 2 ist die Häufigkeit dieser Mosaikexpression aufgeführt. Insgesamt konnte bei 13 (56%) Larven eine starke Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen beobachtet werden. Sieben dieser Tiere zeigten neben der beschriebenen Mosaikexpression ein gewebespezifisches Expressionsmuster von GFP im Pronephros. Bei sechs weiteren transgenen Larven, welche eine starke Mosaikexpression aufwiesen, konnte keine Gewebespezifität beobachtet werden.

Das Vorhandensein des Transgens wurde mittels PCR von genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze einiger *Xenopus laevis* Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) überprüft. Die Abbildung 9A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit einem GFP-spezifischen Primerpaar. In der genomischen DNA der sieben untersuchten Larven lässt sich der GFP-Reporter detektieren.

Die Expression des Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in späteren Entwicklungsstadien, insbesondere im Mesonephros, wurde mittels RT-PCR an freischwimmenden *Xenopus laevis* Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) untersucht (Abbildung 9B). Der GFP-Reporter lässt sich ausschließlich im Mesonephros detektieren. Er kann in den entodermalen Geweben Darm, Leber und Pankreas nicht nachgewiesen werden. Die Kontrollorgane Muskel und Gehirn, welche kein endogenes HNF1 $\alpha$  exprimieren, zeigen erwartungsgemäß kein GFP-spezifisches Signal in der PCR.



**Abbildung 9: Expression des Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.**

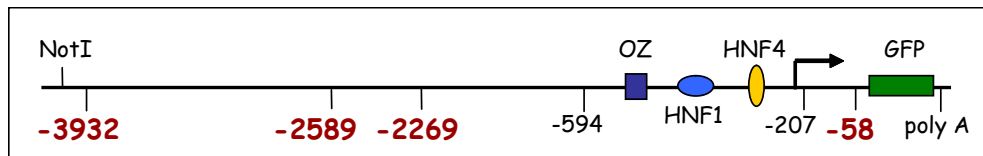
(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze von *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein Fragment des Reportergens GFP. Als Positivkontrolle wurde ein GFP-Fragment aus (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA amplifiziert. Als Negativkontrolle diente genomische DNA einer nicht-injizierten Kontrolllarve. Die Qualität der PCR wurde anhand der H<sub>2</sub>O-Kontrolle überprüft.

(B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach RT-PCR aus isolierten Geweben transgener *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und für eine nachfolgende cDNA-Synthese verwendet. Die anschließende PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein Fragment des Reportergens GFP. Die Qualität und Menge der eingesetzten Gesamt-RNA wurde anhand des konstitutiv exprimierten Gens ODC kontrolliert. Als Positivkontrolle diente RNA einer transgenen Larve.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zum langen HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58), welches sowohl in der mesodermalen Niere als auch in entodermalen Geweben exprimiert wird, die Expression des kurzen Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP vornehmlich auf den Pro-/Mesonephros beschränkt ist. Die entodermale Expression ist stark reduziert und ließ sich nur bei 13% der Larven detektieren. Darüber hinaus ist die Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes mit einer Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen assoziiert. Bei 56% der transgenen Larven ließ sich eine Mosaikexpression in frühen Entwicklungsstadien beobachten. Das kurze Promotorfragment ist folglich nicht ausreichend, um eine korrekte Expression von HNF1 $\alpha$  in transgenen *Xenopus laevis* zu steuern.

### 3.4 DELETIONEN ZUR KARTIERUNG DER 5'-GRENZE DES HNF1 $\alpha$ PROMOTORS, DER EINE GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VERMITTELT

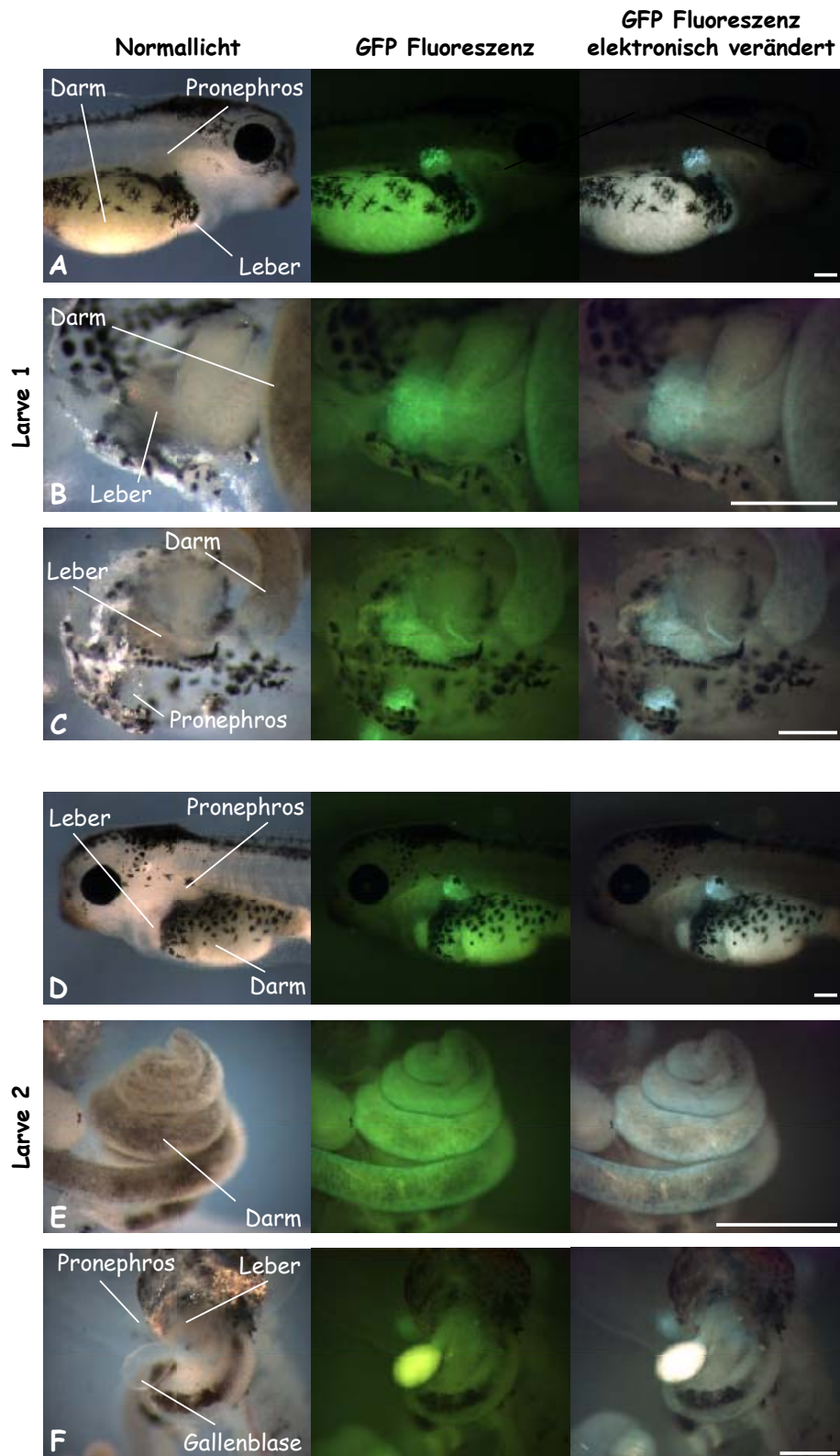
Die oben beschriebenen Experimente zeigen, dass im Gegensatz zum Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP ein kurzes Promotorfragment des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Gens (-594/-58) nicht ausreicht, um eine korrekte Expression des Transgens im *Xenopus* zu erhalten. Im Folgenden sollte durch das Einbringen verschiedener HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukte mit Deletionen zwischen den Positionen -5949bp und -594bp (Abbildung 10) der regulatorische Bereich kartiert werden, der für eine korrekte Expression essentiell ist.



**Abbildung 10: Deletionskonstrukte des HNF1 $\alpha$  Promotors**, welche hinsichtlich ihres Expressionsmusters in transgenen *Xenopus laevis* analysiert wurden. Die schematische Darstellung zeigt die Fragmente des HNF1 $\alpha$  Promotors, welche mit dem GFP Reportergen fusioniert und als Transgen untersucht wurden. Die Promotorkonstrukte (-3932/-58)HNF1 $\alpha$ GFP, (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP und (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP sind angezeigt. Weitere Erläuterungen sind der Abbildung 3 zu entnehmen.

Bei *Xenopus laevis* Larven, welche das Promotorkonstrukt (-3932/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen exprimieren, lässt sich mit dem Filterset zur Detektion von GFP eine grüne Fluoreszenz im Pronephros detektieren, welche durch die elektronische Veränderung des GFP-Signals noch deutlicher wird (Abbildung 11A). In dieser Abbildung kann auch die Leber als GFP-positiv identifiziert werden. Die grüne Fluoreszenz im Darm ist nicht deutlich. Zur besseren Analyse der entodermalen Organe wurde dieselbe Larve fünf Tage nach der Injektion (Stadium 45) seziiert. Die Abbildungen 11B und 11C zeigen Detailaufnahmen der inneren Organe, auf denen mit dem Filterset zur Detektion von GFP eine grüne Fluoreszenz des Reportergens sowohl im Darm als auch in der Leber beobachtet werden kann.

Die Abbildungen 11D bis 11F zeigen ein weiteres Beispiel einer transgenen (-3932/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Larve. Eine grüne Fluoreszenz des Reportergens GFP lässt sich eindeutig im Pronephros detektieren (Abbildung 11D). Zusätzlich zu dieser mesodermalen Expression lässt sich auch in den entodermalen Geweben Darm und Leber ein GFP-positives Signal detektieren (Abbildung 11E und 11F).



**Abbildung 11: Expression des Promotorkonstruktes (-3932/-58)HNF1αGFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Das NotI-linearisierte Promotorkonstrukt (-3932/-58)HNF1αGFP wurde als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier injiziert. Die Abbildungen (A) bis (C) repräsentieren die Aufnahmen einer transgenen Larve, in den Abbildungen (D) bis (F) sind die Aufnahmen einer weiteren transgenen Larve dargestellt. Die lebenden Larven wurden in (A) und (D) in Stadium 40 unter Normallicht (links) und unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (Mitte bzw. elektronisch verändert rechts) photographiert. Die übrigen Abbildungen zeigen Detailaufnahmen der inneren Organe dieser Larven, nachdem sie in Stadium 45 seziiert wurden. Der Größenmaßstab entspricht 250μm. Weitere Erklärungen sind der Abbildung 4 zu entnehmen.

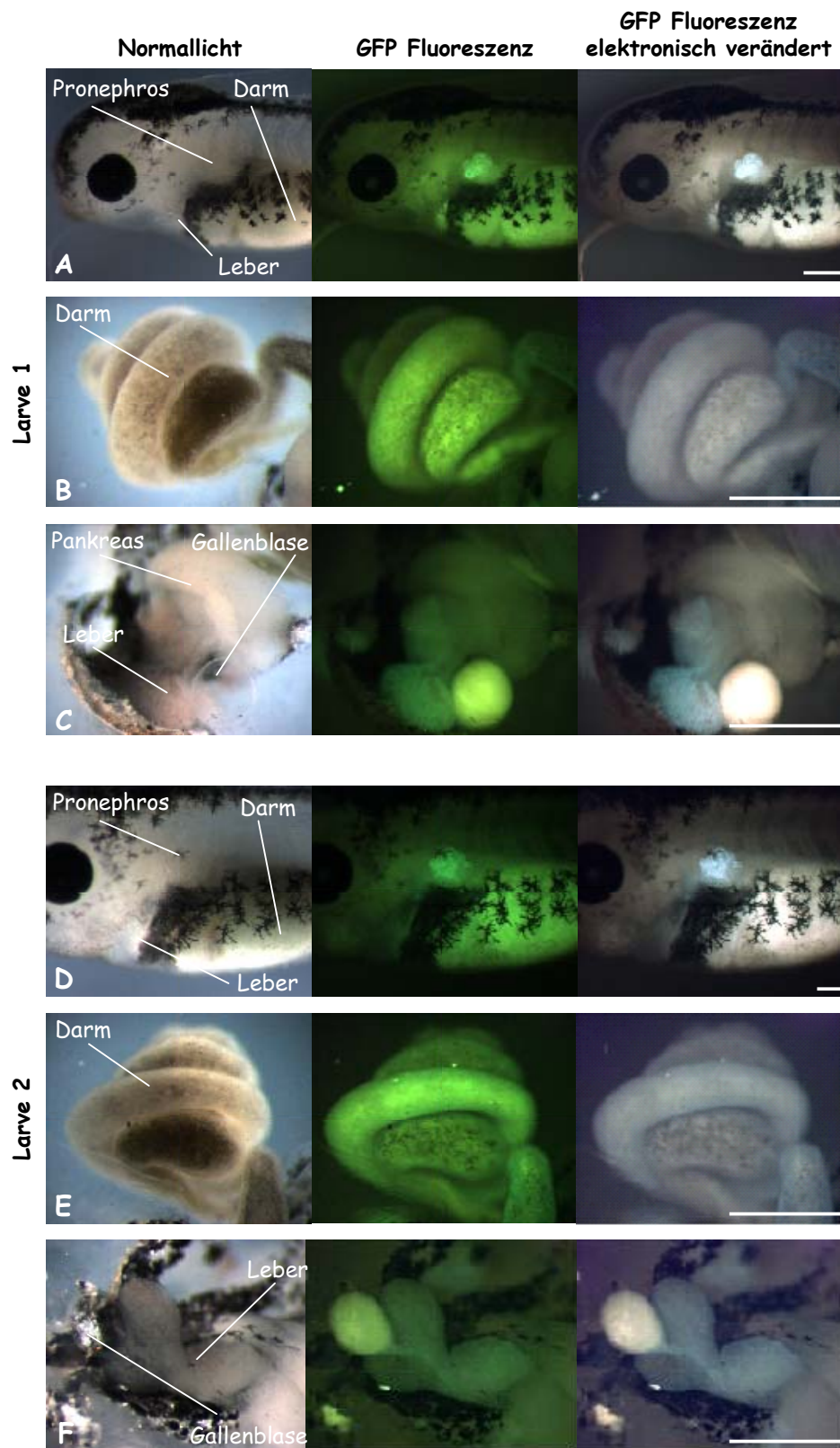


Von 132 analysierten Larven konnte bei 17 Larven eine Expression von GFP detektiert werden (Tabelle 3). 16 (94%) der transgenen Larven wiesen eine mesodermale Expression im Pronephros auf. 15 (88%) Larven zeigten zusätzlich eine entodermale GFP-Fluoreszenz in Darm und Leber. Bei einer Larve konnten in der frühen Embryonalentwicklung GFP-fluoreszierende Einzelzellen detektiert werden. Diese Larve zeigte kein gewebespezifisches Expressionsmuster. Das Expressionsmuster des HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-3932/-58) ist folglich identisch zu demjenigen des langen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-5949/-58) und somit ausreichend, um eine korrekte Expression des HNF1 $\alpha$  Gens zu vermitteln.

**Tabelle 3: Expression des Promotorkonstruktes (-3932/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Eine mesodermale Expression repräsentiert GFP-Fluoreszenz im Pronephros. Eine entodermale Expression bezieht sich auf GFP-Fluoreszenz in Leber und Darm. Transgene Larven mit Mosaikexpression weisen einzelne GFP-fluoreszierende Zellen auf.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)			
				$\Sigma$	Meso- dermal	Ento- dermal	Mosaik
<b>(-3932/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	6600	816	132	17	94% (16)	88% (15)	6% (1)

Dasselbe Expressionsmuster lässt sich mit einem kürzeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragment beobachten, welches einen Bereich von -2589bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst (Abbildung 10). In Abbildung 12 sind zwei Larven dargestellt, welche das Promotorkonstrukt (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen exprimieren. Die Analyse der Larven drei Tage nach der Injektion (Stadium 40) mit dem GFP-spezifischen Filterset zeigt eine grüne Expression des Reporters im Pronephros (Abbildungen 12A und 12D), die nach einer elektronischen Veränderung des Signals noch deutlicher wird. In diesem Stadium lässt sich die GFP-Fluoreszenz in den entodermalen Geweben Darm und Leber nicht eindeutig detektieren. Daher sind in den Abbildungen 12B und 12C bzw. 12E und 12F Detailaufnahmen der inneren Organe derselben Larven dargestellt, welche zur besseren Analyse entodermaler GFP-Expression zwei Tage später seziiert wurden. Beide Larven zeigen sowohl im Darm als auch in der Leber ein GFP-positives Signal. In Abbildung 12C ist der Pankreas zu sehen, welcher jedoch keine Expression von GFP zeigt.



**Abbildung 12: Expression des Promotorkonstruktes (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Das NotI-linearisierte Promotorkonstrukt (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP wurde als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier injiziert. Die Abbildungen (A) bis (C) repräsentieren die Aufnahmen einer transgenen Larve, in den Abbildungen (D) bis (F) sind die Aufnahmen einer weiteren transgenen Larve dargestellt. Die lebenden Larven wurden in (A) und (D) in Stadium 40 unter Normallicht (links) und unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (Mitte bzw. elektronisch verändert rechts) photographiert. Die übrigen Abbildungen zeigen Detailaufnahmen der inneren Organe dieser Larven, nachdem sie in Stadium 45 seziiert wurden. Der Größenmaßstab entspricht 250 $\mu$ m. Weitere Erklärungen sind der Abbildung 4 zu entnehmen.



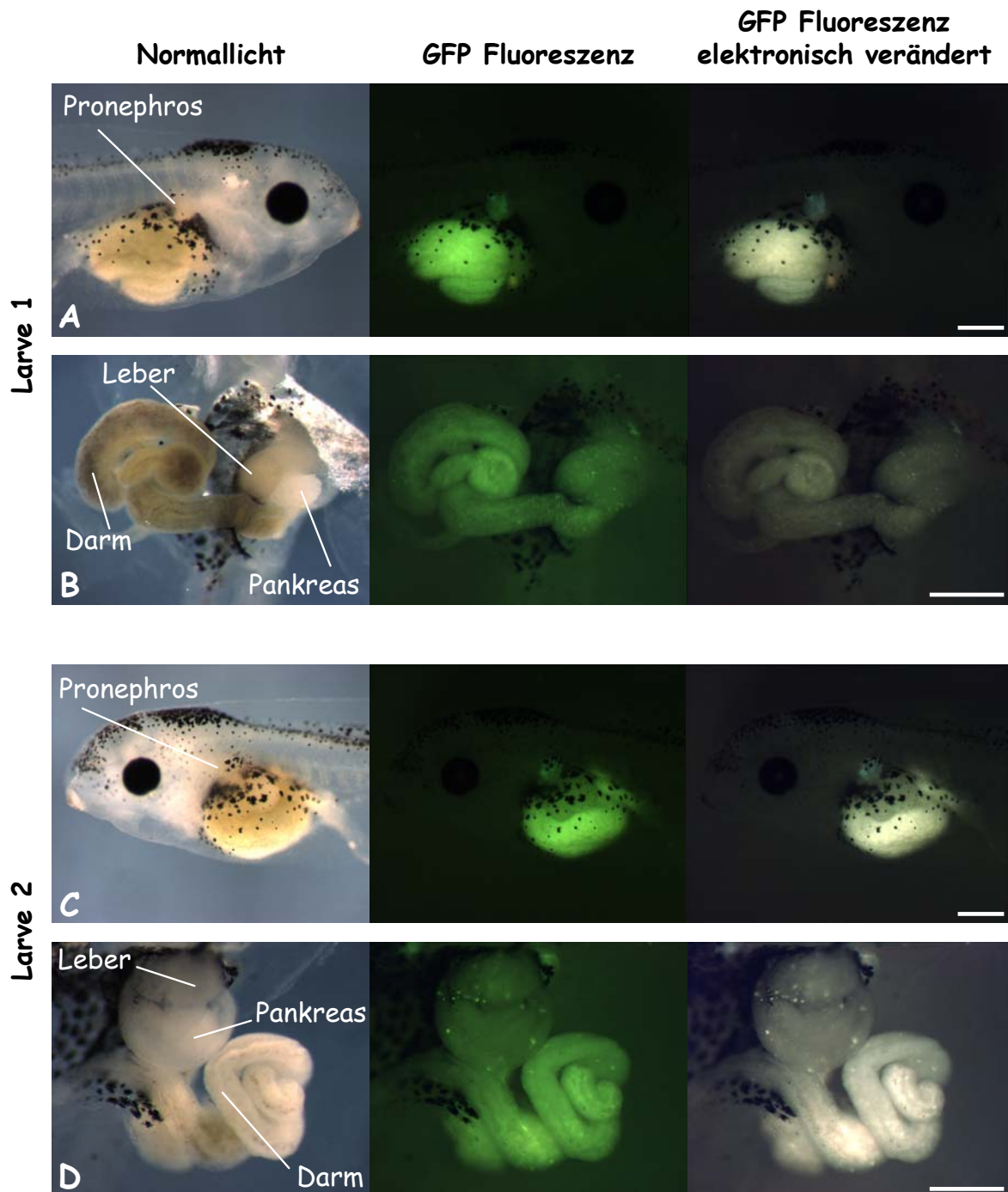
Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist in Tabelle 4 gezeigt. Insgesamt konnte bei 15 Larven eine Expression von GFP detektiert werden. 13 (86%) der transgenen Larven wiesen eine mesodermale Expression im Pronephros auf. Zusätzlich zu dieser mesodermalen Expression zeigten diese Larven eine entodermale GFP-Fluoreszenz in Darm und Leber. Zwei transgene Tiere zeigten in frühen Entwicklungsstadien GFP-fluoreszierende Einzelzellen. Neben dieser Mosaikexpression ließ sich bei diesen Tieren kein gewebespezifisches Expressionsmuster beobachten.

Tabelle 4: **Expression des Promotorkonstruktes (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Eine mesodermale Expression repräsentiert GFP-Fluoreszenz im Pronephros. Eine entodermale Expression bezieht sich auf GFP-Fluoreszenz in Leber und Darm. Transgene Larven mit Mosaikexpression weisen einzelne GFP-fluoreszierende Zellen auf.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)			
				$\Sigma$	Meso- dermal	Ento- dermal	Mosaik
<b>(-2589/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	8700	974	183	15	86% (13)	86% (13)	13% (2)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Promotorkonstrukt (-2589/-58)HNF1 $\alpha$ GFP eine gewebespezifische Expression zeigt, die identisch zu derjenigen des langen (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstruktes ist. Beide HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente werden sowohl in der mesodermalen Niere als auch in den entodermalen Geweben Darm und Leber exprimiert und sind daher ausreichend, um eine korrekte Expression des HNF1 $\alpha$  Gens zu steuern.

In weiteren Experimenten zur Kartierung der 5'-Grenze des HNF1 $\alpha$  Promotors, der eine gewebespezifische Expression vermittelt, wurde ein Fragment des HNF1 $\alpha$  Promotors untersucht, welches einen Bereich von -2269bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst (Abbildung 10). Die Abbildung 13A zeigt eine transgene Larve drei Tage nach der Injektion (Stadium 40), an der mit dem Filterset zur Detektion von GFP eine grüne Fluoreszenz im Pronephros sichtbar ist. Die GFP-Fluoreszenz in den entodermalen Geweben Darm und Leber lässt sich in dieser Abbildung nicht eindeutig detektieren. Die Abbildung 13B zeigt eine Detailaufnahme der inneren Organe derselben Larve, nachdem sie in Stadium 45 seziiert wurde.



**Abbildung 13: Expression des Promotorkonstruktes (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Das NotI-linearisierte Promotorkonstrukt (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP wurde als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier injiziert. Die Abbildungen (A) und (B) repräsentieren die Aufnahmen einer transgenen Larve, in den Abbildungen (C) und (D) sind die Aufnahmen einer weiteren transgenen Larve dargestellt. Die lebenden Larven wurden in (A) und (C) in Stadium 40 unter Normallicht (links) und unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (Mitte bzw. elektronisch verändert rechts) photographiert. Die Abbildungen (B) und (D) zeigen Detailaufnahmen der inneren Organe dieser Larven, nachdem sie in Stadium 45 seziiert wurden. Der Größenmaßstab entspricht 250 $\mu$ m. Weitere Erklärungen sind der Abbildung 4 zu entnehmen.

Weder im Darm noch in der Leber lässt sich ein GFP-positives Signal detektieren. Auch auf dem in der Abbildung 13B gekennzeichneten Pankreas lässt sich keine Expression des Reportergens detektieren.

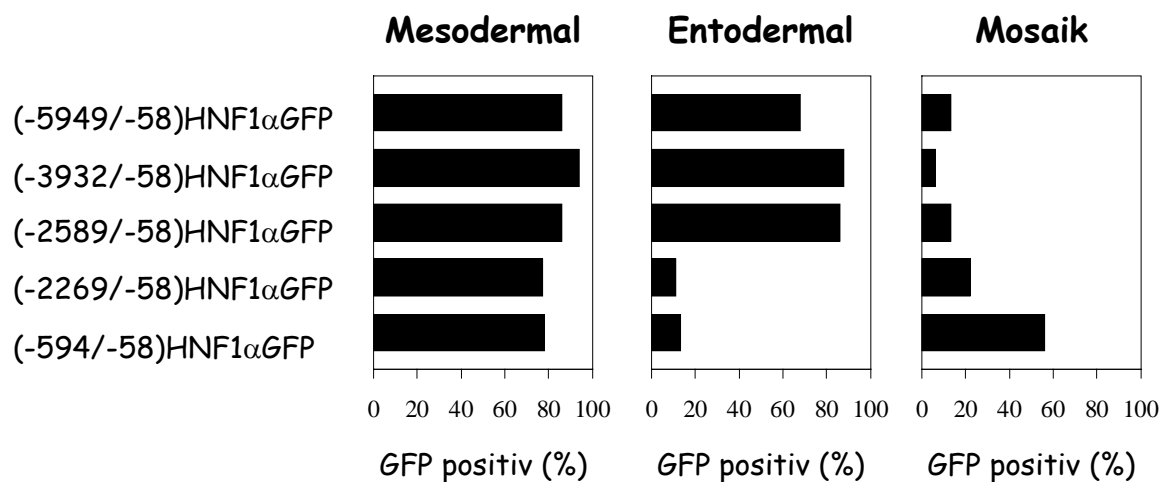
Die Abbildungen 13C und 13D zeigen ein weiteres Beispiel einer Larve, welche das Promotorkonstrukt (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen aufweist. Das Expressionsmuster dieser Larve ist identisch zu dem oben beschriebenen Beispiel (Abbildung 13A und 13B). GFP lässt sich ausschließlich im Pronephros detektieren.

Von 132 analysierten Larven, bei denen Kopf und Schwanz eindeutig identifizierbar waren, konnte bei 18 Larven eine Expression von GFP detektiert werden (Tabelle 5). 14 (77%) transgene Larven wiesen eine mesodermale Expression im Pronephros auf. Neben dieser mesodermalen Expression wiesen nur zwei (11%) Larven eine zusätzliche GFP-Fluoreszenz in entodermalen Geweben wie Darm und Leber auf. Bei vier (22%) transgenen Tieren zeigten sich vereinzelt GFP-fluoreszierende Zellen. Das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-2269/-58) ist folglich nicht ausreichend, um eine entodermale Expression des Transgens zu steuern. Genauso wie das kurze HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) wird es vorwiegend in der Niere exprimiert. Die Expression von GFP in entodermalen Geweben wie Darm und Leber ist stark reduziert.

Tabelle 5: **Expression des Promotorkonstruktes (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis*.** Eine mesodermale Expression repräsentiert GFP-Fluoreszenz im Pronephros. Eine entodermale Expression bezieht sich auf GFP-Fluoreszenz in Leber und Darm. Transgene Larven mit Mosaikexpression weisen einzelne GFP-fluoreszierende Zellen auf.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)			
				$\Sigma$	Meso-dermal	Ento-dermal	Mosaik
<b>(-2269/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	10230	1145	157	18	77% (14)	11% (2)	22% (4)

In Abbildung 14 sind die oben beschriebenen Ergebnisse der Analyse unterschiedlicher Deletionskonstrukte des HNF1 $\alpha$  Promotors in transgenen *Xenopus laevis* zusammengefasst. Die längeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (-5949/-58; -3932/-58; -2589/-58) sind ausreichend, um eine HNF1 $\alpha$  Expression sowohl im Pronephros als auch in den entodermalen Geweben Darm und Leber zu steuern. Im Gegensatz dazu konnte bei der Analyse der Expression der kürzeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (-2269/-58; -594/-58) ein Verlust entodermaler GFP-Expression beobachtet werden. Diese Promotorkonstrukte werden in transgenen *Xenopus laevis* Larven vorwiegend im mesodermalen Pronephros exprimiert. Nur bei 11% (-2269/-58) bzw. 13% (-594/-58) der transgenen Tiere ließ sich eine GFP-Fluoreszenz in entodermalen Geweben wie Darm und Leber detektieren. Neben dem Verlust der entodermalen Expression des Transgens ist die Expression der kürzeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente mit einer Mosaikexpression stark GFP-fluoreszierender Einzelzellen verbunden. Diese Mosaikexpression ließ sich bei 56% (-594/-58) bzw. 22% (-2269/-58) der transgenen Larven beobachten.



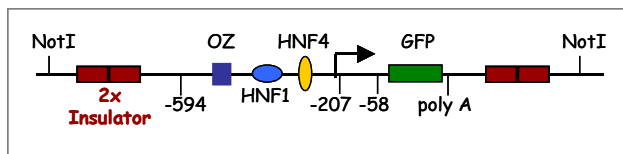
**Abbildung 14: Zusammenfassung der Expression unterschiedlicher HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente in transgenen *Xenopus laevis*.** Die Ergebnisse der Tabellen 1-5 wurden zusammengefasst und die Expression der unterschiedlichen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente hinsichtlich der prozentualen Expression in mesodermalen (Niere) und entodermalen (Darm, Leber) Geweben dargestellt. Zusätzlich ist die prozentuale Anzahl der Tiere aufgeführt, die in frühen Entwicklungsstadien eine Mosaikexpression GFP-fluoreszierender Einzelzellen zeigen.

Der Verlust der entodermalen Expression und die häufig auftretende Mosaikexpression der kürzeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente deuten darauf hin, dass zwischen den Positionen -2589bp und -2269bp des HNF1 $\alpha$  Promotors die 5'-Grenze einer regulatorischen Sequenz liegt, welche den Promotor des Transgens von umliegenden Regulationselementen der

Integrationsstelle isoliert. Solche Elemente sind sowohl bei *Drosophila* als auch bei höheren Vertebraten als Insulatoren beschrieben worden. Diese Insulatoren sind unter anderem durch ihre Fähigkeit charakterisiert, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzusichern.

### 3.5 EIN MIT INSULATOREN FLANKIERTES PROMOTORKONSTRUKT INS(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP VERMITTELT EINE KORREKTE EXPRESSION DES TRANSGENS

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der gut beschriebene 5'-HS4 Insulator des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns (Chung et al., 1997) die Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) in seiner Spezifität beeinflussen kann, so dass eine korrekte Expression des Transgens erfolgt. Dazu wurde das kurze Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit je zwei Kopien des 1,2kb Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns flankiert (Abbildung 15) und als Transgen in *Xenopus laevis* untersucht.



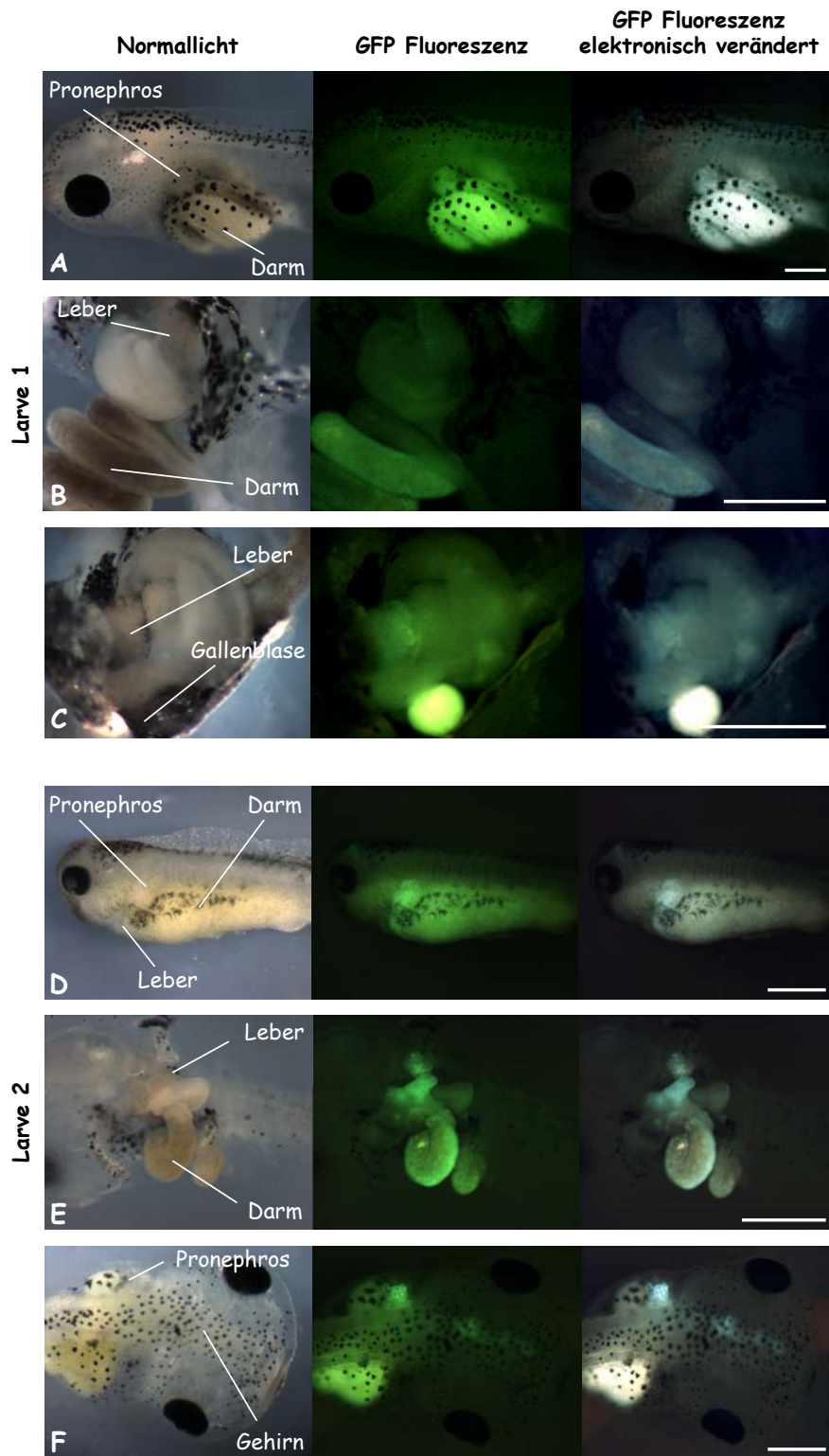
**Abbildung 15: Das Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen.** Jeweils zwei Kopien des 1,2kb Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns flankieren das kurze Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP. Um Einflüsse der Plasmidsequenz auszuschalten, wurde das Promotorkonstrukt mit zwei NotI-Schnittstellen flankiert, so dass dem Transgen die für die Klonierung notwendigen bakteriellen Sequenzen fehlen. Weitere Erklärungen sind der Abbildung 6 zu entnehmen.

Die Abbildung 16 zeigt zwei *Xenopus* Larven, welche das Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen exprimieren. Auf der in Abbildung 16A gezeigten lateralen Aufnahme einer transgenen Larve drei Tage nach der Injektion (Stadium 40) lässt sich mit dem Filterset zur Detektion von GFP eine grüne Fluoreszenz im Pronephros detektieren, die durch die elektronische Veränderung des GFP-Signals noch deutlicher wird. Die grüne Fluoreszenz der entodermalen Gewebe Darm und Leber ist in dieser Ansicht nicht deutlich. Zur besseren Analyse der entodermalen Organe wurde dieselbe Larve zwei Tage später (Stadium 45) seziiert (Abbildungen 16B und 16C). In Abbildung 16B ist die grüne

Fluoreszenz des Reportergens GFP im Darm eindeutig erkennbar. In Abbildung 16C lässt sich mit dem Filterset zur Detektion von GFP die grüne Fluoreszenz in der Leber detektieren.

Die Abbildungen 16D bis 16F zeigen eine weitere Larve, welche das Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen aufweist. Das Reportergen GFP wird im mesodermalen Pronephros (Abbildung 16D) sowie in den entodermalen Geweben Darm und Leber (Abbildung 16E) exprimiert. Die Abbildung 16F zeigt die dorsale Ansicht der Gehirnregion dieser Larve. In einem spezifischen Bereich des Gehirns lässt sich ein GFP-positives Signal erkennen. In derselben Abbildung lässt sich auch die grüne Fluoreszenz des Pronephros detektieren.

Tabelle 6 zeigt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. 293 Larven zeigten eine Kopf-Schwanz-Differenzierung und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Insgesamt ließ sich bei 30 Larven eine Expression von GFP detektieren. 29 (96%) Larven wiesen eine Expression im mesodermalen Pronephros auf. Im Gegensatz zum kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58), wo nur bei 13% der Larven eine zusätzliche Expression von GFP in entodermalen Geweben wie Leber und Darm beobachtet werden konnte, zeigten beim insulierten Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP 23 (76%) Larven eine GFP-Fluoreszenz in entodermalen Geweben. Die Häufigkeit der Mosaikexpression wird durch das Flankieren des kurzen Promotorkonstruktes mit Insulatoren deutlich reduziert. Nur bei 2 (7%) Larven konnten einzelne GFP-fluoreszierende Zellen detektiert werden. Eine Larve zeigte neben dieser Mosaikexpression GFP-positive Signale in Pronephros, Darm und Leber. Die in Abbildung 16F gezeigte grüne Fluoreszenz in einem spezifischen Bereich des Gehirns konnte nur bei dieser einen transgenen Larve detektiert werden.



**Abbildung 16: Ein Flankieren des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit Insulatoren resultiert in einer korrekten Expression des Transgens.** Das NotI-restringierte Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP wurde als Transgen in unbefruchtete *Xenopus laevis* Eier injiziert. Die Abbildungen (A) bis (C) repräsentieren die Aufnahmen einer transgenen Larve, in den Abbildungen (D) bis (F) sind die Aufnahmen einer weiteren transgenen Larve dargestellt. Die lebenden Larven wurden in (A) in Stadium 40 und in (D) in Stadium 35/36 unter Normallicht (links) und unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (Mitte bzw. elektronisch verändert rechts) photographiert. In den Abbildungen (B), (C) und (E) sind Detailaufnahmen der inneren Organe dieser Larven dargestellt, nachdem sie in Stadium 45 seziiert wurden. Die Abbildung (F) zeigt eine dorsale Ansicht der Gehirnregion einer lebenden Larve in Stadium 45. Der Größenmaßstab entspricht 250 $\mu$ m. Weitere Erklärungen sind der Abbildung 4 zu entnehmen.



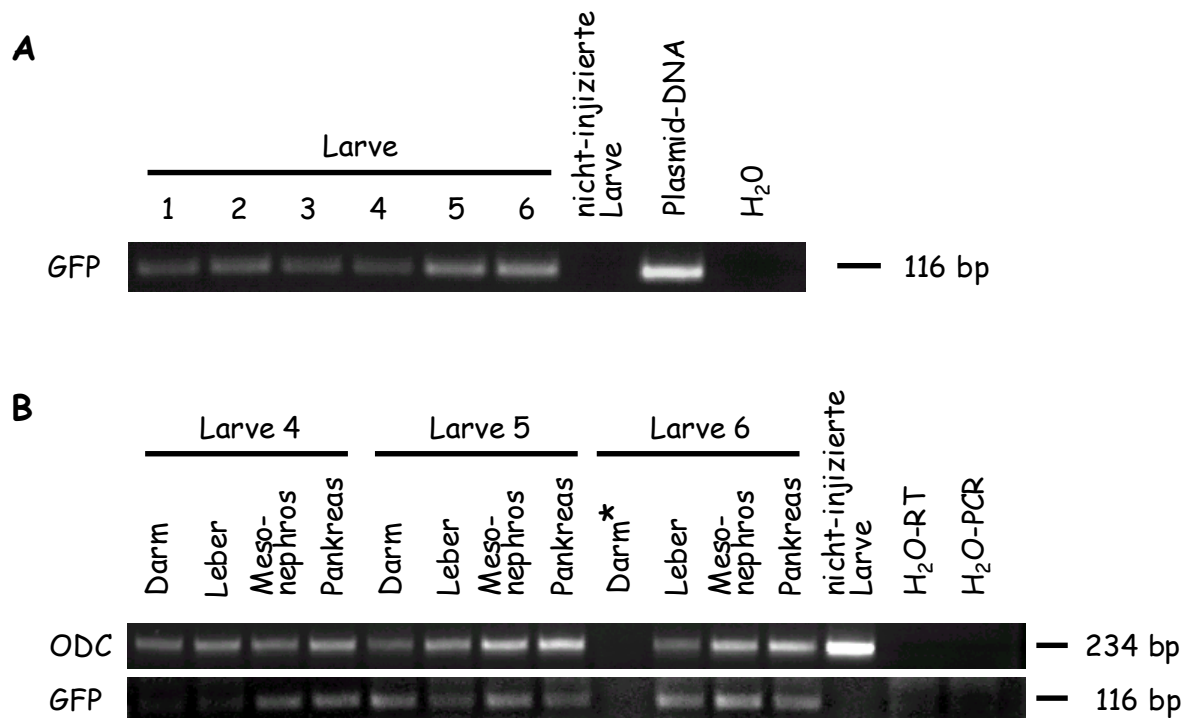
**Tabelle 6: Ein Flankieren des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit Insulatoren resultiert in einer korrekten Expression des Transgens.** Eine mesodermale Expression repräsentiert GFP-Fluoreszenz im Pronephros. Eine entodermale Expression bezieht sich auf GFP-Fluoreszenz in Leber und Darm. Transgene Larven mit Mosaikexpression weisen einzelne GFP-fluoreszierende Zellen auf.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)			
				$\Sigma$	Meso- dermal	Ento- dermal	Mosaik
<b>Ins(-594/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	18800	1758	293	30	93% (28)	76% (23)	7% (2)

Das Vorhandensein des Transgens wurde mittels PCR von genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze dieser *Xenopus laevis* Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) überprüft (Abbildung 17A). In der genomischen DNA der sechs untersuchten Larven lässt sich das GFP-Reportergen detektieren.

Das Expressionsprofil des insulierten Promotorkonstruktes Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP freischwimmender *Xenopus laevis* Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) wurde mittels RT-PCR untersucht. Die Abbildung 17B zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Ein GFP-positives Signal lässt sich sowohl im Mesonephros als auch in den entodermalen Geweben Darm, Leber und Pankreas nachweisen. Dieses Expressionsprofil entspricht somit demjenigen des langen Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP. Die GFP-Expression des insulierten Promotorkonstruktes lässt sich bei Larve 4 nur im Mesonephros und im Pankreas detektieren.





**Abbildung 17: Ein Flankieren des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit Insulatoren resultiert in einer korrekten Expression des Transgens.**

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze von *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein Fragment des Reportergens GFP. Als Positivkontrolle wurde ein GFP-Fragment aus Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA amplifiziert. Als Negativkontrolle diente genomische DNA einer nicht-injizierten Kontrolllarve. Die Qualität der PCR wurde anhand der H<sub>2</sub>O-Kontrolle überprüft.

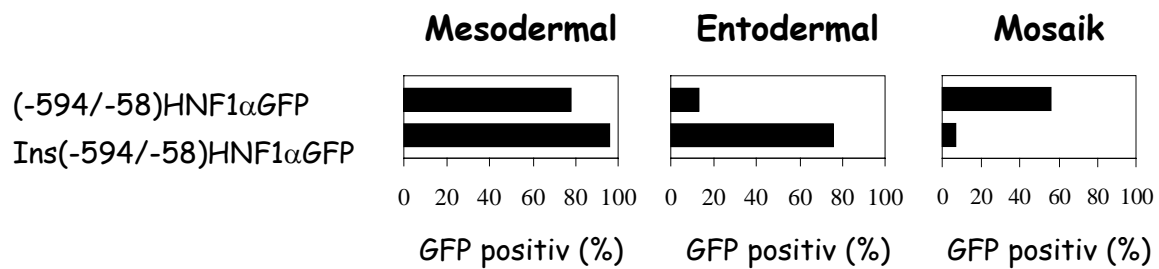
(B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach RT-PCR von isolierten Geweben transgener *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und für eine nachfolgende cDNA-Synthese verwendet. Die anschließende PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein Fragment des Reportergens GFP. Qualität und Menge der eingesetzten Gesamt-RNA wurde anhand des konstitutiv exprimierten Gens ODC kontrolliert.

\* Reverse Transkription (RT) nicht erfolgreich, da zu wenig RNA isoliert wurde.

In Abbildung 18 ist ein Vergleich der Expressionsmuster des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) und des mit Insulatoren flankierten Promotorkonstruktes Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP dargestellt.

Das kurze HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) wird vorwiegend in der mesodermalen Niere exprimiert. 78% der transgenen Larven zeigten eine Expression des Reportergens im Pronephros. Im Gegensatz dazu wiesen nur 13% der transgenen Larven eine zusätzliche Expression des GFP-Reporters in entodermalen Geweben auf. Ein Flankieren des kurzen Promotorkonstruktes mit Insulatoren resultiert in einer korrekten Expression von HNF1 $\alpha$  in transgenen *Xenopus laevis* Larven sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben. 93% der transgenen Larven exprimierten das insulierte Promotorkonstrukt im Pronephros. Zusätzlich zu dieser mesodermalen Expression wurde das Transgen bei 76% der

Larven in Geweben entodermalen Ursprungs exprimiert. Desweiteren verringern Insulatoren die Häufigkeit einer Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen. Während 56% der transgenen (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP *Xenopus laevis* Larven eine transiente Mosaikexpression in frühen Entwicklungsstadien zeigten, konnte diese nur bei 7% der Larven beobachtet werden, welche das Transgen Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP aufwiesen.



**Abbildung 18: Ein Flankieren des kurzen Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit Insulatoren resultiert in einer korrekten Expression des Transgens.** Die Ergebnisse der Tabellen 2 und 6 wurden zusammengefasst und die Expression der unterschiedlichen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente hinsichtlich der prozentualen Expression in mesodermalen (Niere) und entodermalen (Darm, Leber) Geweben dargestellt. Zusätzlich ist die prozentuale Anzahl der Tiere aufgeführt, die in frühen Entwicklungsstadien eine Mosaikexpression GFP-fluoreszierender Einzelzellen zeigen.

### 3.6 CHARAKTERISIERUNG DER REPORTERLINIEN INS(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP UND (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP


Um die Vererbung des Transgens an die Nachkommen und somit die stabile Integration des Transgens in das Genom zu untersuchen, wurden *Xenopus* Larven, welche das Transgen Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in Geweben entodermaler und mesodermaler Herkunft exprimieren, aufgezogen. Innerhalb eines Jahres entwickelten sich vier Larven zu geschlechtsreifen Tieren. Die Eier eines transgenen Weibchens wurden mit Spermien von Wildtyp-Männchen befruchtet. Die Vererbung der transgenen Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA über die Keimbahn wurde an der F<sub>1</sub>-Generation untersucht, indem die Larven, welche eine Kopf-Schwanz-Differenzierung zeigten, in verschiedenen Entwicklungsstadien hinsichtlich einer Expression des Reportergens GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden.

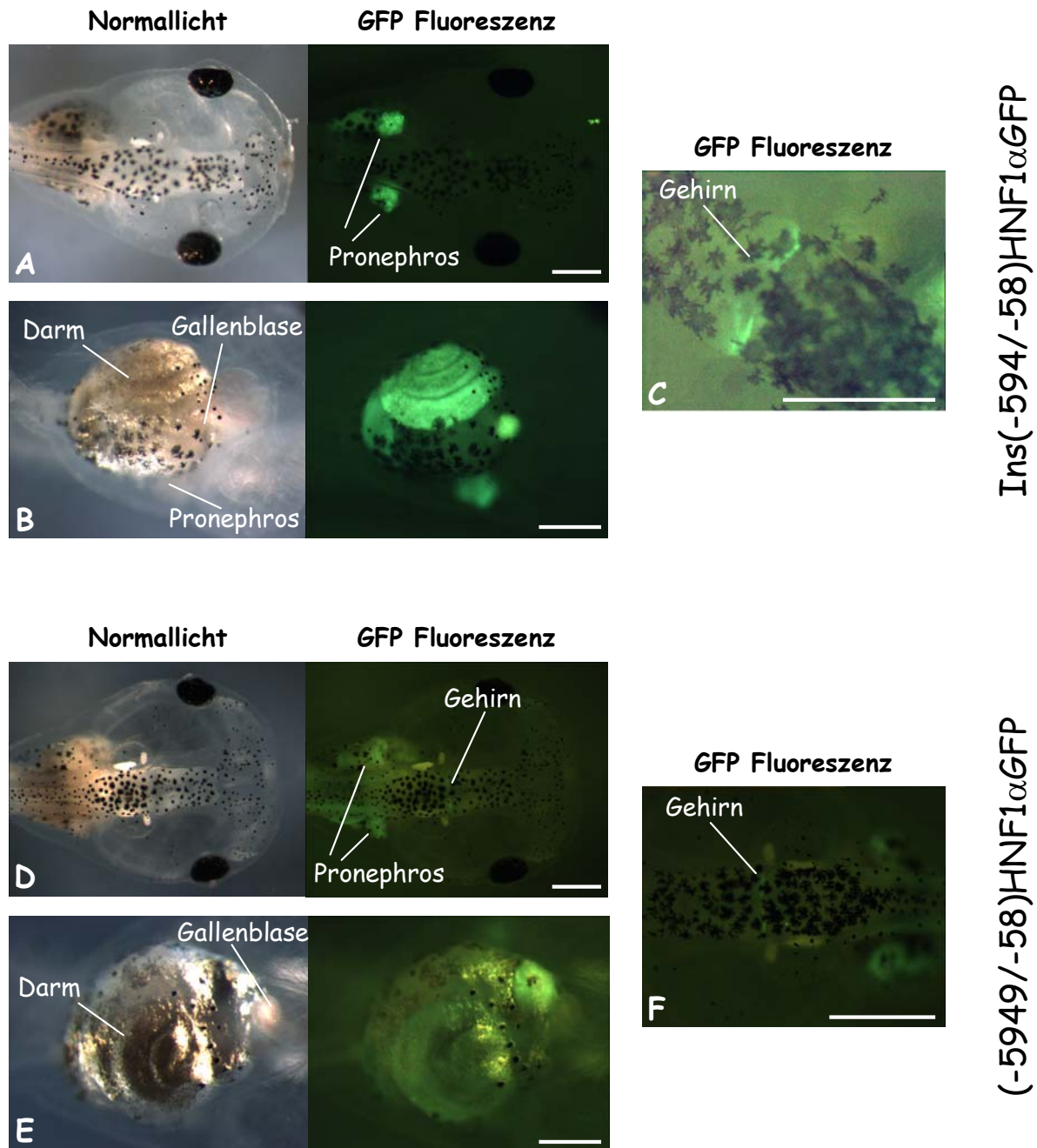
Die Abbildungen 19A bis 19C zeigen ein Beispiel einer freischwimmenden Larve, welche das Transgen *Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP* exprimiert, fünf Tage nach der Befruchtung (Stadium 45). In Abbildung 19A ist eine dorsale Aufnahme dieser Larve gezeigt, an der mit dem Filterset zur Detektion von GFP die grüne Fluoreszenz des GFP-Reporters im Pronephros eindeutig zu erkennen ist. Die Abbildung 19B zeigt eine Aufnahme derselben Larve in ventraler Ansicht. Deutlich zu erkennen ist ein GFP-positives Signal im Darm. Zusätzlich zu dieser Expression in mesodermalen und entodermalen Geweben lässt sich bei der Larve eine Expression von GFP in einem spezifischen Bereich des Gehirns detektieren (Abbildung 19C).

In Tabelle 7 sind die Expressionsmuster der 231 analysierten Larven der F<sub>1</sub>-Generation zusammengefasst. 57 (25%) Larven zeigten eine GFP-Fluoreszenz sowohl im Pronephros als auch in entodermalen Geweben wie Darm und Leber. Bei den anderen Larven konnte kein GFP-positives Signal detektiert werden. Von den 57 transgenen Larven zeigten acht Larven eine zusätzliche Expression des Transgens in einer scharf begrenzten Region des Gehirns.

**Tabelle 7: Charakterisierung von F<sub>1</sub>-Larven der Reporterlinien *Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP* und *(-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP*.** Die Larven wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem GFP-spezifischen Filterset analysiert.

\* GFP-Fluoreszenz in mesodermalen (Pronephros) und entodermalen Geweben (Darm, Leber).

Reporterlinie	F <sub>1</sub> -Generation 		
	Gesamt	GFP-positiv*	GFP Gehirn
<i>Ins(-594/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</i>	231	57	8
<i>(-5949/-58)HNF1<math>\alpha</math>GFP</i>	33	24	18



**Abbildung 19: Charakterisierung von F<sub>1</sub>-Larven der Reporterlinien Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP und (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP.** Die gezeigten Xenopus Larven entwickelten sich aus Eiern eines transgenen Weibchens, die mit Spermien eines Wildtyp-Männchens befruchtet wurden. Die Larven wurden mit dem Leica MZ/FLIII Stereomikroskop analysiert und mit der KAPPA Kamera PS 30C photographiert. Die Larven wurden in Stadium 45 sowohl unter Normallicht (links) als auch unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP-spezifischen Filterset (rechts) photographiert. Bei Normallicht analysierte Larven wurden ohne Filter photographiert. Der Größenmaßstab entspricht 250 $\mu$ m. (**A**) und (**D**): Dorsale Ansicht einer lebenden Larve in Stadium 45, (**B**) und (**E**): Ventrale Ansicht einer lebenden Larve in Stadium 45, (**C**) und (**F**): Dorsale Detailaufnahme der Gehirnregion einer lebenden Larve in Stadium 45.

Frühere Analysen der F<sub>1</sub>-Generation eines geschlechtsreifen Weibchens, welches das Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP stabil exprimiert (erzeugt von Prof. Gerhart U. Ryffel, 2000), zeigten ebenfalls bei einigen Nachkommen eine Expression des Transgens in einer scharf begrenzten Region des Gehirns. Um zu untersuchen, ob das Transgen in derselben Region des Gehirns exprimiert wird, wurde dieses Weibchen erneut mit Spermien von Wildtyp-Männchen befruchtet. Die Larven der F<sub>1</sub>-Generation wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich einer Expression des Reportergens GFP untersucht.

Die Abbildungen 19D bis 19F zeigen ein Beispiel einer freischwimmenden F<sub>1</sub>-Larve fünf Tage nach der Befruchtung (Stadium 45), welche das Transgen (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP exprimiert. Mit dem GFP-spezifischen Filterset lässt sich auf der in Abbildung 19D dargestellten dorsalen Aufnahme dieser Larve deutlich die grüne Fluoreszenz des GFP-Reporters im Pronephros erkennen. Zusätzlich zu dieser mesodermalen Expression des Reportergens im Pronephros lässt sich auf der in Abbildung 19E dargestellten ventralen Aufnahme dieser Larve eine Expression von GFP im Darm detektieren. Neben der mesodermalen und entodermalen Expression des GFP-Reporters lässt sich in der Abbildung 19F eine Expression von GFP in der gleichen scharf begrenzten Region des Gehirns detektieren, wie zuvor bei den Larven der F<sub>1</sub>-Generation des geschlechtsreifen Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Weibchens beobachtet wurde.

Tabelle 7 stellt das Expressionsmuster von Larven der F<sub>1</sub>-Generation zusammen, welche das Transgen (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP stabil exprimieren. Von 33 analysierten Larven, bei denen Kopf und Schwanz eindeutig zu erkennen waren, zeigten 24 (72%) Larven eine GFP-Fluoreszenz sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben. Bei den übrigen neun Larven ließ sich keine Expression von GFP nachweisen. 18 GFP-positive Tiere zeigten eine zusätzliche Expression des Transgens in einer scharf begrenzten Region des Gehirns.

Die Analyse von Larven der F<sub>1</sub>-Generation der Reporterlinien Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP und (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP machen deutlich, dass das Transgen auf die Nachkommen übertragen und dort auch exprimiert wird.

### 3.7 ANALYSE REGULATORISCHER ELEMENTE MIT TRANSFEKTIONEN VON HNF1 $\alpha$ GENKONSTRUKTEN

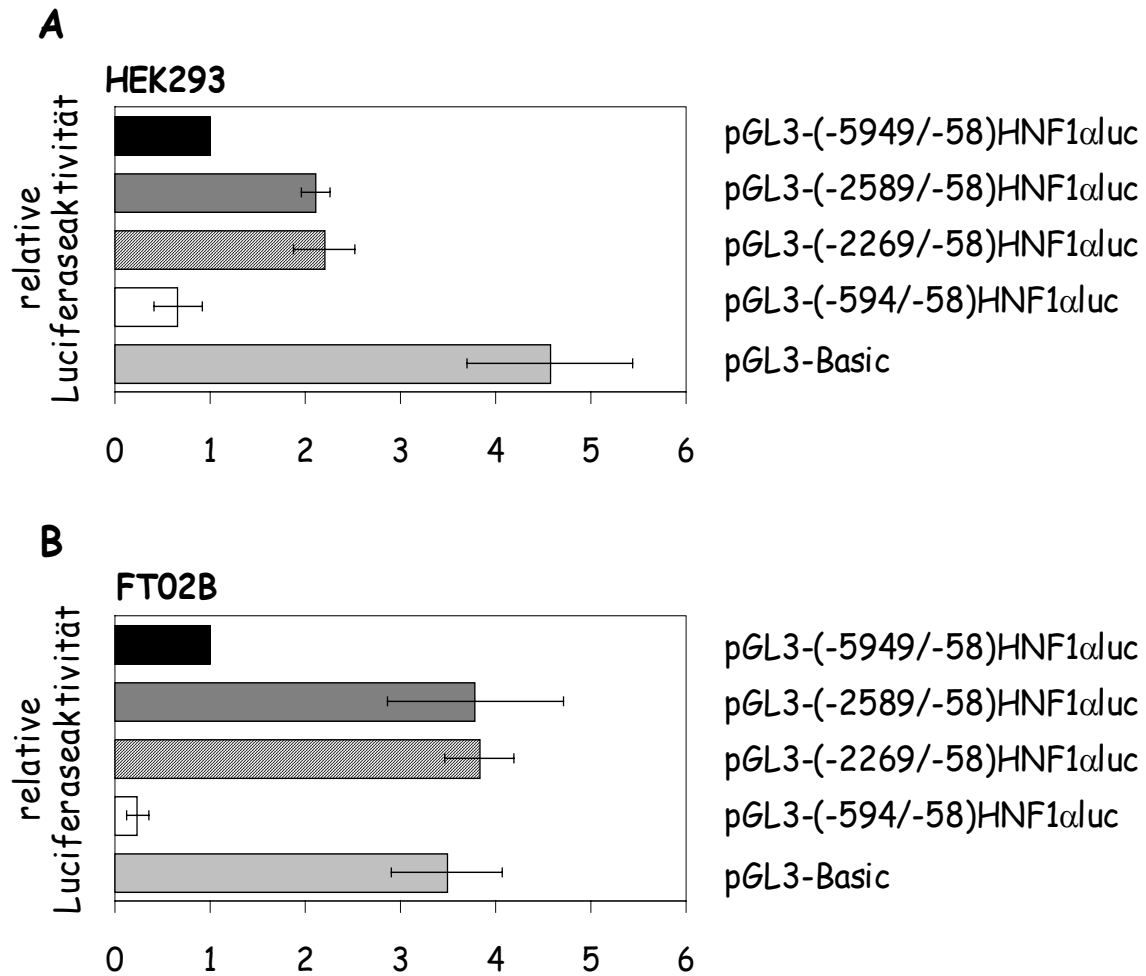
Die Analyse unterschiedlicher HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente in transgenen *Xenopus laevis* zeigte, dass die kürzeren Promotorfragmente (-2269/-58; -594/-58) nicht ausreichen, um eine korrekte Expression des Transgens zu steuern. Die Untersuchung von 5'-Deletionen im HNF1 $\alpha$  Promotor stromabwärts von der Position -2589bp erbrachte in transgenen *Xenopus* einen Verlust entodermaler HNF1 $\alpha$ -Expression in Darm und Leber, jedoch keine Veränderung der Expression in der mesodermalen Niere.

Mit Hilfe transienter Transfektionsexperimente von HNF1 $\alpha$  Genkonstrukten in unterschiedlich differenzierte Zellen sollten Regulationselemente im *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotor analysiert werden, die für den Verlust entodermaler HNF1 $\alpha$ -Expression nach einer Deletion stromabwärts von der Position -2589bp verantwortlich sind. Für diese Untersuchungen wurden zwei Zelllinien unterschiedlicher Herkunft verwendet. HEK293 stellt eine immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen dar. Bei FT02B-Zellen handelt es sich um eine Leberkarzinomzelllinie der Ratte. Das Transaktivierungspotential der HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukte in der Nieren- und Leberzelllinie wurde nach transienter Transfektion über die Aktivität des Reportergens Luciferase bestimmt. Dazu wurde der in den transgenen *Xenopus* Larven untersuchte GFP-Reporter der HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte durch Luciferase ersetzt. Es sollte untersucht werden, ob die kürzeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (-2269/-58; -594/-58), welche in transgenen *Xenopus* Larven ausschließlich in der mesodermalen Niere exprimiert werden, *in vitro* eine Aktivität aufweisen, welche auf die Nierenzelllinie HEK293 beschränkt ist, sich jedoch nicht in der Leberzelllinie FT02B nachweisen lässt. Die Zellen wurden transient mit den HNF1 $\alpha$ luc Reportergenkonstrukten transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt.

In Abbildung 20 sind die relativen Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Reportergenkonstrukte gezeigt. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des langen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-5949/-58), welches in transgenen *Xenopus* Larven sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben exprimiert wird. Die Abbildung 20A zeigt das Transaktivierungsverhalten der Nierenzelllinie HEK293. Die Transfektion des Reportergenkonstruktes pGL3-(-2589/-58)HNF1 $\alpha$ luc führt zu einer Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität um das doppelte, was auf einen Verlust eines negativen Regulationselementes durch die Deletion zwischen den Positionen -5949bp und -2589bp des

HNF1 $\alpha$  Promotors hindeutet. Das Transaktivierungspotential des Reportergenkonstruktes pGL3-(-2269/-58)HNF1 $\alpha$ luc weist in etwa den gleichen Wert auf wie des Reportergenkonstruktes pGL3-(-2589/-58)HNF1 $\alpha$ luc. Im Gegensatz dazu führt die Transfektion des Reportergenkonstruktes pGL3-(-594/-58)HNF1 $\alpha$ luc zu einer Reduktion der relativen Luciferaseaktivität unter den Vergleichswert des pGL3-(-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP. Diese Reduktion deutet auf ein positives Regulationselement zwischen den Positionen -2269bp und -594bp des HNF1 $\alpha$  Promotors hin. Beim Vergleich der Transaktivierungspotentiale der HNF1 $\alpha$ luc Reportergenkonstrukte mit dem promotorlosen Reportergenkonstrukt pGL3-Basic wird deutlich, dass die Aktivität der HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente deutlich unter der Aktivität des pGL3-Basic liegt. Das in Abbildung 20B dargestellte Transaktivierungsverhalten der Leberzelllinie FT02B entspricht dem Transaktivierungsverhalten von HEK293-Zellen. Die Analyse der Transfektion unterschiedlicher HNF1 $\alpha$ luc Reportergenkonstrukte deutet auf ein negatives Regulationselement zwischen den Positionen -5949bp und -2589bp sowie auf ein positives Regulationselement zwischen den Positionen -2269bp und -594bp hin. Auch in FT02B-Zellen weist das promotorlose Reportergenkonstrukt pGL3-Basic eine höhere Aktivität auf als die HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente.

Mit der Transfektion unterschiedlicher HNF1 $\alpha$  Genkonstrukte konnte kein Unterschied im Transaktivierungsverhalten der Nierenzelllinie HEK293 und der Leberzelllinie FT02B detektiert werden. Diese Zellkulturuntersuchungen eignen sich folglich nicht für die Analyse regulatorischer Elemente im HNF1 $\alpha$  Promotor, welche in transgenen Larven für den Verlust entodermaler Expression nach einer Deletion stromabwärts von Position -2589bp verantwortlich sind.



**Abbildung 20: Relative Luciferaseaktivität von HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukten.** Relative Luciferaseaktivität von HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukten bei transienter Transfektion in (A) HEK293-Zellen und (B) FT02B-Zellen. Die Zellen wurden mit 1,3 $\mu$ g Reportergenkonstrukt transfiziert, 24 Stunden später wurde ein Luciferaseassay durchgeführt. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des promotorlosen Reportergenkonstruktes pGL3-Basic. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Werten an.



### **3.8 ANALYSE DER „ENHANCER BLOCKING“ AKTIVITÄT VON INSULATOREN IN ZELLKULTUREXPERIMENTEN**

Durch Deletionen im Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotor konnte gezeigt werden, dass eine Deletion stromabwärts von der Position -2589bp in transgenen Xenopus zu einem Verlust entodermaler Expression führt, während die Expression des Promotorfragmentes in der mesodermalen Niere unverändert bleibt (Kapitel 3.4). Neben dem Verlust entodermaler Expression ließ sich auch eine deutliche Erhöhung GFP-fluoreszierender Einzelzellen (Mosaikexpression) in der frühen Embryonalentwicklung detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein Flankieren eines kurzen (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstruktes mit Insulatoren des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns in einer korrekten Expression des Transgens in mesodermalen und entodermalen Geweben resultiert (Kapitel 3.5). Durch das Flankieren des Promotorkonstruktes mit Insulatoren kann das Promotorelement vor Einflüssen des umliegenden Chromatins geschützt werden.

Neben dieser Fähigkeit, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen, werden Insulatoren durch ihre Fähigkeit charakterisiert, bei einer Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer blockieren zu können. Um weitere Hinweise für die Existenz eines Insulatorelementes im Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotor zu erhalten, wurden verschiedene Fragmente des Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotors hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die Aktivierung eines Promotors durch einen Enhancer blockieren zu können.

#### **3.8.1 „ENHANCER BLOCKING“ AKTIVITÄT DES $\beta$ -GLOBIN INSULATORS DES HUHNS**

Der hinsichtlich seiner „Enhancer Blocking“ Aktivität wohl am besten untersuchte Insulator ist der 5'-HS4 Insulator des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns. Seine „Enhancer Blocking“ Aktivität konnte in transienten Transfektionsexperimenten erythroleukämischer 6C2-Zellen des Huhns sowie in QT6-Fibroblastenzellen der Qualle nachgewiesen werden (Recillas-Targa et al., 1999).

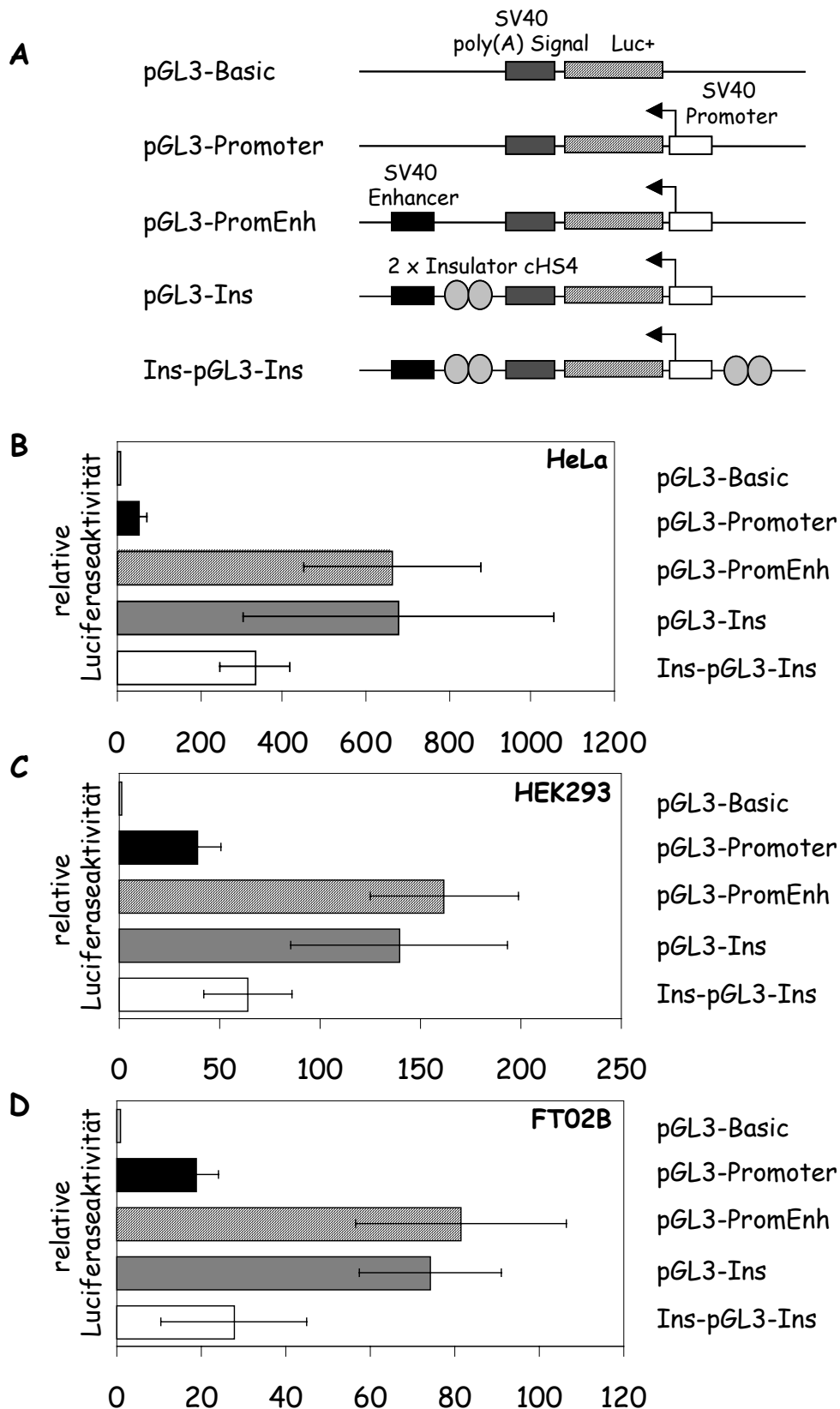
Um die „Enhancer Blocking“ Aktivität dieses Insulators in leicht zu transfizierenden Zelllinien, welche üblicherweise für Transfektionsexperimente verwendet werden (HeLa, HEK293 und FT02B), analysieren zu können, wurde eine doppelte Kopie des 1,2kb Insulators

des  $\beta$ -Globin Gens des Huhns zwischen den SV40 Promotor und den SV40 Enhancer des Reporter-genkonstruktes pGL3-PromEnh (Abbildung 21A) kloniert. Da bei einem circulären Plasmid die Interaktion zwischen Promotor und Enhancer nur durch Insulatoren blockiert werden kann, wenn diese auf beiden Seiten des Enhancers lokalisiert sind, wurde ein weiteres Konstrukt hergestellt (Ins-pGL3-Ins), das auf beiden Seiten des Enhancers eine doppelte Insulatorkopie enthält.

Die oben aufgeführten Zelllinien unterschiedlicher Herkunft wurden transient mit den circulären Reporter-genkonstrukten transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt.

In Abbildung 21 sind die relativen Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Reporter-genkonstrukte gezeigt. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des promotorlosen Reporter-genkonstruktes pGL3-Basic. Die Abbildung 21B zeigt die relativen Luciferaseaktivitäten der Reporter-genkonstrukte in HeLa-Zellen. Wie erwartet führt die Anwesenheit des SV40 Promotors (pGL3-Promotor) zu einer Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität im Vergleich zum promotorlosen Reporter-genkonstrukt pGL3-Basic. Das Reporter-genkonstrukt pGL3-PromEnh weist neben dem SV40 Promotor einen SV40 Enhancer auf, welcher die relative Luciferaseaktivität signifikant steigert. Der auf einer Seite des Reporter-genkonstruktes pGL3-PromEnh lokalisierte Insulator hat keinen Einfluß auf die relative Luciferaseaktivität des Reporter-genkonstruktes pGL3-PromEnh. Im Gegensatz dazu zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Reporter-genkonstrukten pGL3-PromEnh2 und Ins-pGL3-Ins. Ein Flankieren des SV40 Enhancers mit je zwei Kopien des Insulators des Huhns resultiert somit in einer drastischen Reduktion der Luciferaseaktivität.

In Abbildung 21C sind die relativen Luciferaseaktivitäten der entsprechenden Reporter-genkonstrukte in HEK293-Zellen gezeigt, Abbildung 21D zeigt die relativen Luciferaseaktivitäten in FT02B-Zellen. Auch in diesen Zelllinien ist ein Flankieren des Enhancers mit je zwei Kopien des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns notwendig, damit der Insulator die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer blockieren kann.

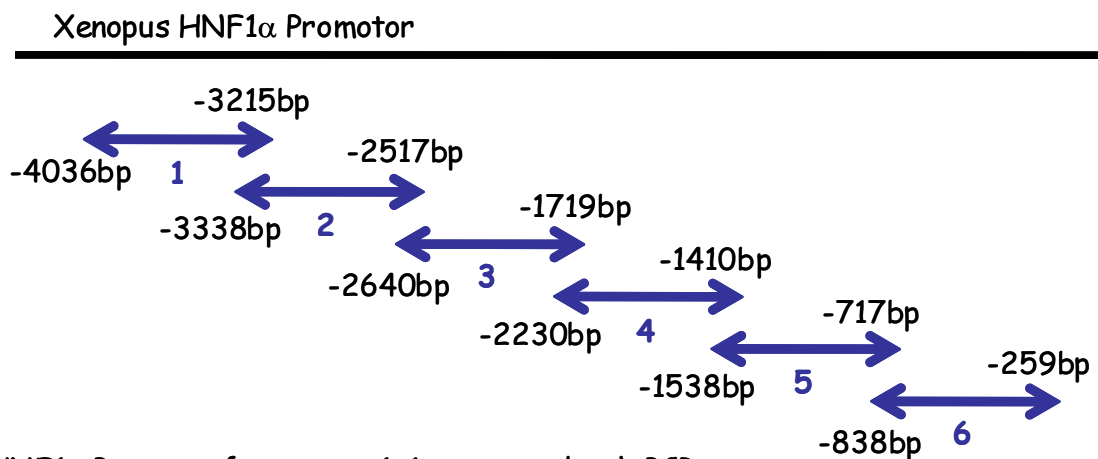


**Abbildung 21: „Enhancer Blocking“ Aktivität des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns.** Relative Luciferaseaktivität verschiedener Reporterergenkonstrukte (**A**) bei transienter Transfektion in (**B**) HeLa-Zellen, (**C**) HEK293-Zellen, (**D**) FT02B-Zellen. Die Zellen wurden mit 1,3 $\mu$ g Reporterergenkonstrukt transfiziert, 24 Stunden später wurde ein Luciferaseassay durchgeführt. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des promotorlosen Reporterergenkonstruktes pGL3-Basic. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

Die oben aufgeführten Experimente machen deutlich, dass der von Recillas-Targa et al. (1999) veröffentlichte Assay zur Untersuchung der „Enhancer Blocking“ Aktivität des 5'-HS4 Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns in 6C2-Zellen für die Zelllinien HeLa, HEK293 und FT02B etabliert werden konnte. In jeder der untersuchten Zelllinien konnte durch transiente Transfektion entsprechender Reportergenkonstrukte die „Enhancer Blocking“ Aktivität des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns nachgewiesen werden.

### **3.8.2 „ENHANCER BLOCKING“ AKTIVITÄT DES XENOPUS HNF1 $\alpha$ PROMOTORS**

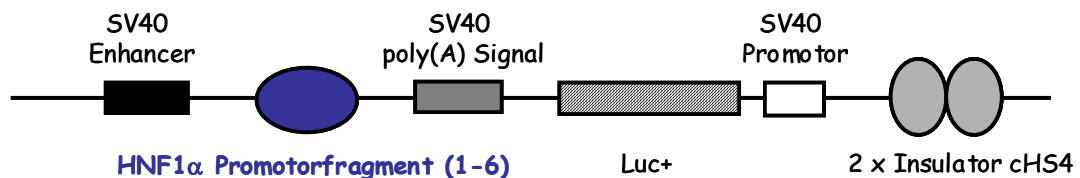
Um den Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotor hinsichtlich seiner „Enhancer Blocking“ Aktivität untersuchen zu können, wurden sechs überlappende Fragmente des Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotors, welche einen Bereich von -4036bp bis -259bp relativ zur Translationsstartstelle abdecken, mit PCR amplifiziert (Abbildung 22A). Diese HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (1-6) wurden zwischen den SV40 Enhancer und den SV40 Promotor des Reportergenkonstruktes pGL3-Ins kloniert (HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins), so dass der SV40 Enhancer dieses Konstruktes auf der einen Seite von einer doppelten Kopie des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns und auf der anderen Seite von einem HNF1 $\alpha$  Promotorfragment flankiert ist (Abbildung 22B).

**A**

HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente 1-6 erzeugt durch PCR

**B**

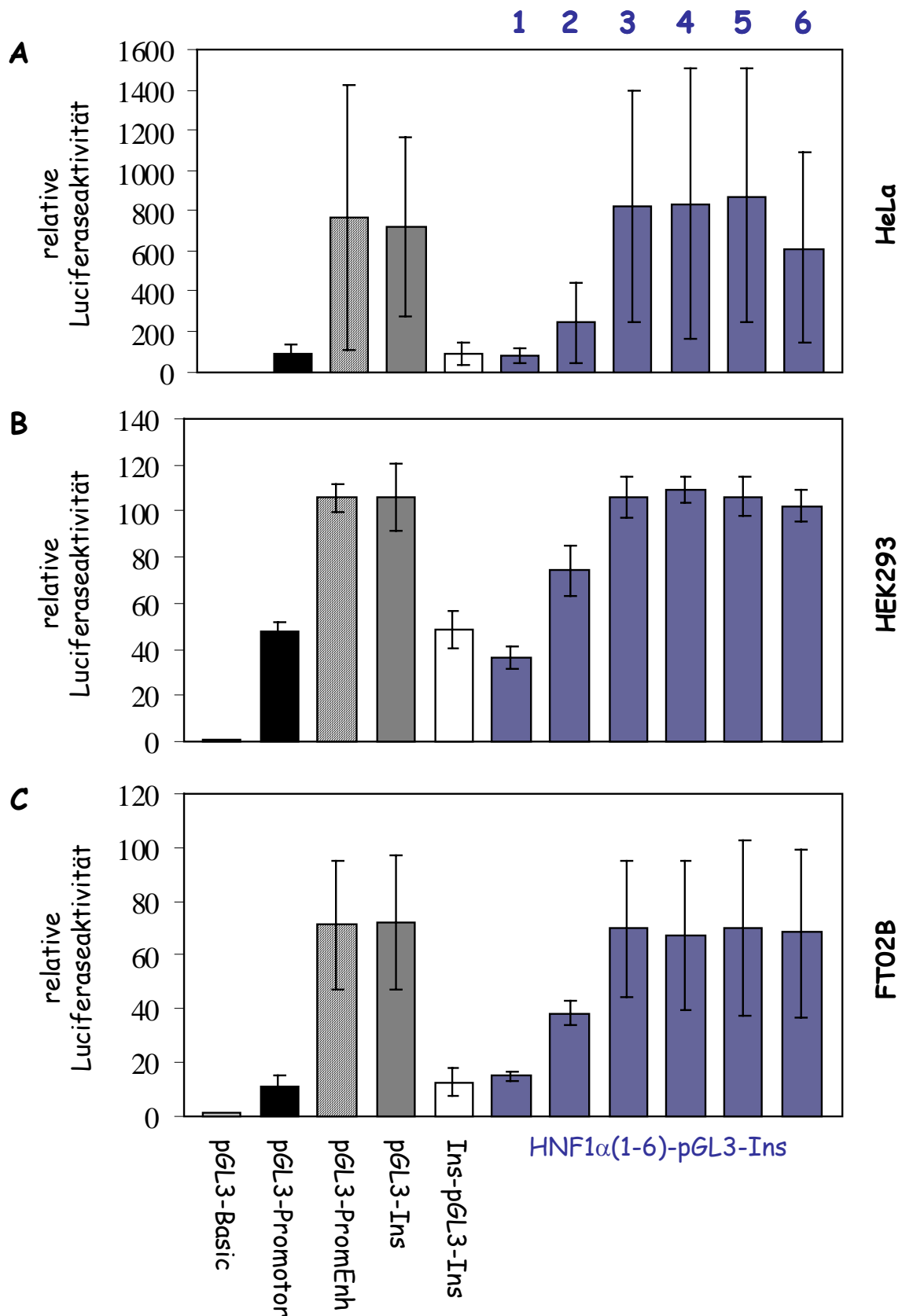
### Reportergenkonstrukte HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins



**Abbildung 22: Herstellung der Reportergenkonstrukte HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins.** (A) Schematische Darstellung des Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotors. Überlappende HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (1-6) wurden mit PCR amplifiziert. Die Positionen beziehen sich auf die Distanz zur Translationsstartstelle (ATG). (B) Überlappende HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente wurden in das Reportergenkonstrukt Ins-pGL3 zwischen SV40 Enhancer und SV40 Promotor kloniert, um die Konstrukte HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins herzustellen.

Um die Wirkung dieser HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente auf die Aktivierung des SV40 Promotors durch den SV40 Enhancers zu analysieren, wurden die Reportergenkonstrukte transient in die Zelllinien HeLa, HEK293 und FT02B transfiziert.

In Abbildung 23 sind die relativen Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Reportergenkonstrukte gezeigt. Die Abbildung 22A zeigt die relativen Luciferaseaktivitäten für HeLa-Zellen. Die Insertion des HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes 1 (HNF1 $\alpha$ (1)-pGL3-Ins) verringert die relative Luciferaseaktivität des Reportergenkonstruktes pGL3-PromEnh mit einer Effektivität, die dem Reportergenkonstrukt Ins-pGL3-Ins ähnelt. Die „Enhancer Blocking“ Aktivität dieses HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes weist demnach eine ähnliche Stärke auf wie die des bekannten 5'-HS4 Insulators des  $\beta$ -Globin Gens des Huhns. Auch das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment 2 zeigt „Enhancer Blocking“ Aktivität, allerdings mit geringerer Stärke.



**Abbildung 23: „Enhancer Blocking“ Aktivität unterschiedlicher Fragmente des Xenopus HNF1α Promotors.** Relative Luciferaseaktivität verschiedener Reporter-genkonstrukte bei transienter Transfektion in (A) HeLa-Zellen, (B) HEK293-Zellen, (C) FT02B-Zellen. Die Zellen wurden mit 1,3µg Reporter-genkonstrukt transfiziert, 24 Stunden später wurde ein Luciferaseassay durchgeführt. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des promotorlosen Reporter-genkonstruktes pGL3-Basic. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Werten an.

Im Gegensatz dazu können die HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente 3 bis 6 die Interaktion von SV40 Enhancer und SV40 Promotor nicht blockieren, da die relative Luciferaseaktivität der Reporterengenkonstrukte HNF1 $\alpha$ (3-6)-pGL3-Ins den gleichen Wert aufweist wie die des Reporterengenkonstruktes pGL3-PromEnh.

In Abbildung 23B sind die relativen Luciferaseaktivitäten für HEK293-Zellen aufgeführt, Abbildung 23C zeigt die Ergebnisse in FT02B-Zellen. Ebenso wie in HeLa-Zellen weisen die HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente 1 und 2 in diesen beiden Zelllinien „Enhancer Blocking“ Aktivität auf. Während die Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes 1 eine ähnliche Stärke aufweist wie die des bekannten Insulators des  $\beta$ -Globin Gens des Huhns, kann das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment 2 die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer nur mit einer geringeren Aktivität blockieren. Wie schon in HeLa-Zellen beobachtet werden konnte, weisen die HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente 3 bis 6 auch in HEK293- und FT02B-Zellen keine „Enhancer Blocking“ Aktivität auf.

### 3.9 CTCF-BINDESTELLEN IM XENOPUS HNF1 $\alpha$ PROMOTOR

Bei der Analyse der „Enhancer Blocking“ Aktivität unterschiedlicher Fragmente des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors konnte gezeigt werden, dass zwei HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (Fragment 1: -4036bp bis -3215bp; Fragment 2: -3338bp bis -2517bp) die Interaktion zwischen Promotor und Enhancer reduzieren können (Kapitel 3.8.2). Untersuchungen des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns zeigten, dass für die „Enhancer Blocking“ Aktivität des Vertebraten-Insulators eine Bindestelle für den multivalenten Transkriptionsfaktor CTCF notwendig ist, welcher mit unterschiedlichen Anteilen seiner elf Zinkfinger 40-50bp lange DNA-Bereiche mit variabler Basenkomposition bindet, die nur einen geringen Konsensus in ihrer Sequenz zeigen (Bell et al., 1999). Mit Hilfe von Gelretardationsanalysen sollte der *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotor hinsichtlich potentieller CTCF-Bindestellen analysiert werden.

Die zur Herstellung der transgenen *Xenopus laevis* Larven konstruierten HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert werden, einen spezifischen CTCF-DNA-Komplex zu kompetitieren. Für eine spezifische Komplexbildung zwischen CTCF und DNA wurde eine bekannte CTCF-Bindestelle (FII) des Vertebraten-Insulators 5'-HS4 aus dem  $\beta$ -Globin-Gen des Huhns verwendet (Bell et al., 1999). Für die Kompetitionsanalysen wurde der Inkubationslösung zusätzlich zu dem radioaktiv markierten

DNA-Fragment FII ein Überschuss an nicht markierten HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukten als Kompetitoren zugesetzt.

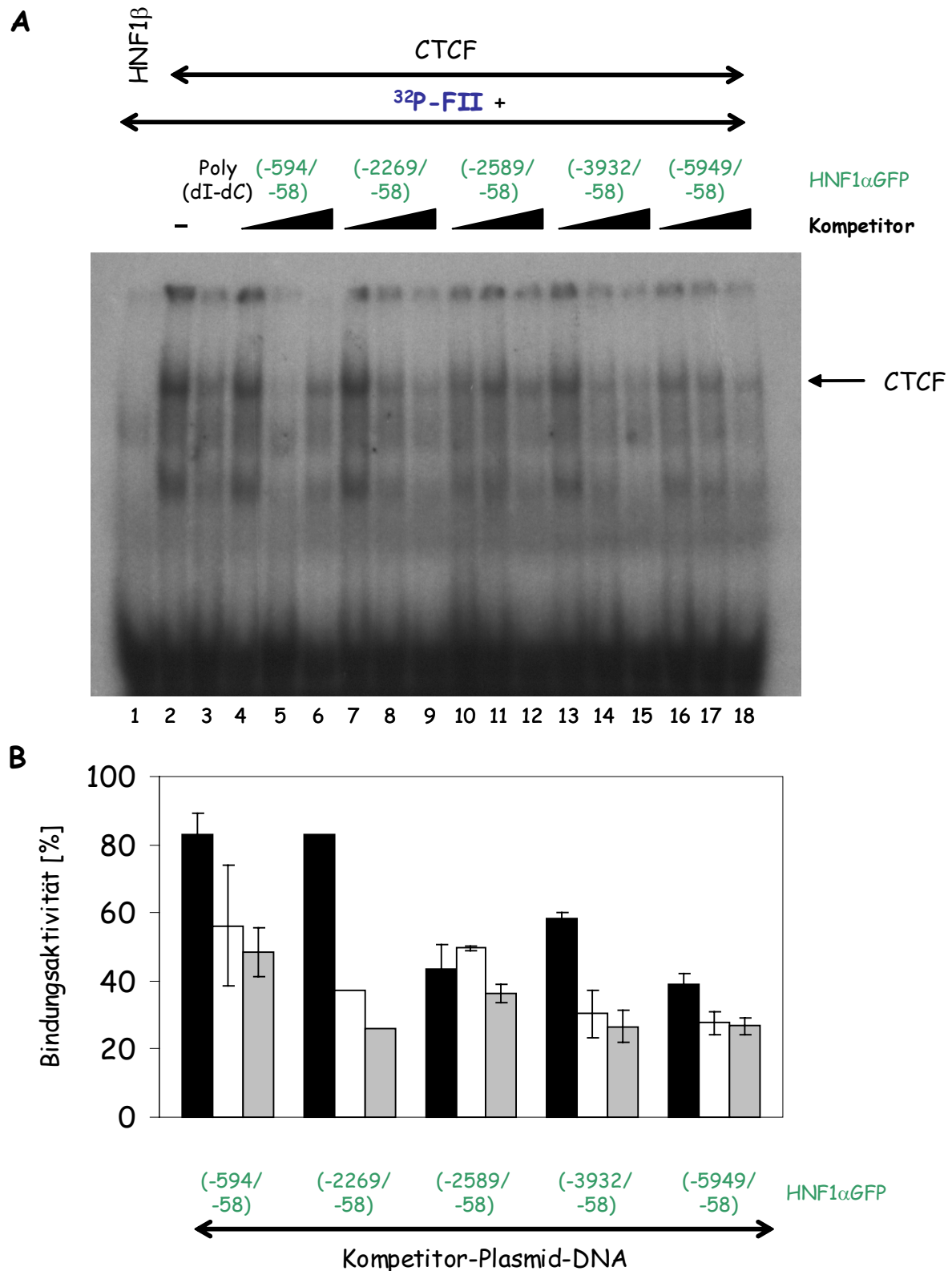
In Abbildung 24A ist ein exemplarischer Gelretardations-Kompetitions-Assay dargestellt. Synthetisch hergestelltes CTCF bindet an die bekannte CTCF-Bindestelle FII des Vertebraten-Insulators 5'-HS4 aus dem  $\beta$ -Globin Gen des Huhns (Spur 2). Dies ist eine spezifische Bindung, da keine Komplexbildung zwischen dem synthetisch hergestellten Protein HNF1 $\beta$  und der CTCF-Bindestelle FII detektiert werden kann (Spur 1). Bei Zugabe des unspezifischen Kompetitors Poly(dI-dC) nimmt die Signalintensität des CTCF-DNA-Komplexes ab (Spur 3). Unterschiedliche Mengen an nicht-markierten HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukten wurden hinsichtlich ihrer Konkurrenzseigenschaften untersucht (30ng, 150ng, 300ng).

Um die Konkurrenzseigenschaften der HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte quantitativ auswerten zu können, wurden die exponierten Filme mittels PhosphorImager ausgewertet (Abbildung 24B). Die Quantifizierung zeigt, dass die Signalintensität des spezifischen CTCF-DNA-Komplexes bei Zugabe der Promotorkonstrukte (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP und (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in einer Konzentration von 30ng nahezu unverändert bleibt (82-83% Bindungsaktivität), was darauf hindeutet, dass die Sequenzen dieser Kompetitoren nicht die gleichen Bindungseigenschaften aufweisen wie die CTCF-Bindestelle FII. Erst in hohen Konzentrationen (150ng, 300ng) können die kurzen HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte die Signalintensität des spezifischen CTCF-DNA-Komplexes verringern. Diese vermutlich unspezifische Beeinflussung der Komplexbildung lässt sich jedoch bei nahezu jeder beliebigen Plasmid-DNA in hohen Konzentrationen beobachten.

Im Gegensatz dazu verringern die längeren HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte (-2589/-58), (-3932/-58) und (-5949/-58) schon in einer Konzentration von 30ng die Signalintensität des spezifischen CTCF-DNA-Komplexes (39-58% Bindungsaktivität). Die Abnahme der Signalintensität des spezifischen Komplexes deutet darauf hin, dass die langen HNF1 $\alpha$ GFP Kompetitoren das Protein CTCF binden können.

Die Konkurrenzexperimente deuten auf das Vorhandensein von CTCF-Bindestellen im *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotor, welche stromaufwärts von Position -2269bp lokalisiert sind.





**Abbildung 24: Potentielle CTCF-Bindestellen im *Xenopus* HNF1α Promotor.** (A) Gelretardations-Kompetitions-Assay. 3μl synthetisch hergestelltes Protein wurden mit einer radioaktiv markierten bekannten CTCF-Bindestelle des Insulators 5'-HS4 aus dem β-Globin-Gen des Huhns (FII) inkubiert. In Spur 3 wurden 30ng Poly(dI-dC) zu dem Reaktionsansatz gegeben. Linearisierte HNF1αGFP Promotorkonstrukte wurden als nicht-markierte Kompetitoren in aufsteigenden Konzentrationen (30ng, 150ng, 300ng) hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, einen spezifischen CTCF-DNA-Komplex zu kompetitieren (Spuren 4-18). (B) Quantifizierung mittels PhosphorImager. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Werten an. Die Eigenschaften des Promotorkonstruktes (-2269/-58)HNF1αGFP wurden in nur einem Kompetitionsexperiment untersucht.

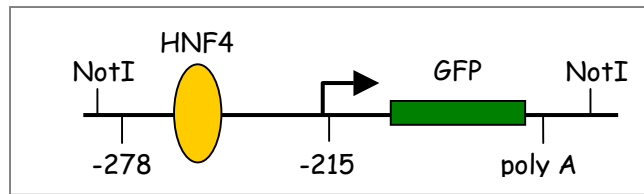
### **3.10 AUFBAU EINES ARTIFIZIELLEN PROMOTORS, DER EINE GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VERMITTELT**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Promotorkonstruktes (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen *Xenopus laevis* Larven vornehmlich auf die mesodermale Niere beschränkt ist. In einer von Ryffel und Lingott (2000) veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass die in diesem Promotorfragment lokalisierte HNF4-Bindestelle des HNF1 $\alpha$  Promotors notwendig für eine mesodermale Expression ist. Während eine Deletion dieser Bindestelle im HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) keinen Einfluß auf die entodermale Expression des Transgens in *Xenopus* hat, geht die Expression im mesodermalen Pronephros infolge der Mutation verloren.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die HNF4-Bindestelle des HNF1 $\alpha$  Promotors als zellspezifisches Element ausreichend ist, um die Expression des Reportergens GFP zu steuern. Dazu wurde ein minimales Promotorelement, welches als zellspezifisches Element die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 $\alpha$  Gen und als basalen Promotor die 3'-flankierende Sequenz der HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 $\alpha$  Promotor aufweist, mit dem GFP-Reporter fusioniert und als Transgen in *Xenopus* untersucht.

#### **3.10.1 EINE HNF4-BINDESTELLE DES HNF1 $\alpha$ PROMOTORS REICHT NICHT AUS, UM EINE EXPRESSION VON GFP ZU VERMITTELN**

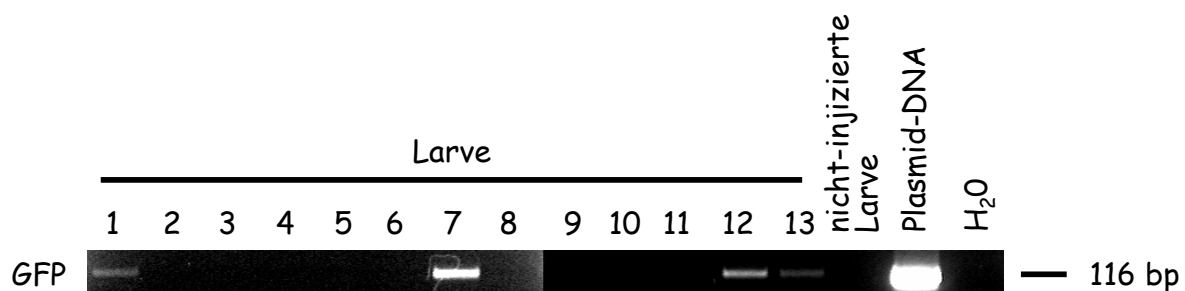
Ein Transgen, welches als zellspezifisches Element die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 $\alpha$  Gen und als basalen Promotor die 3'-flankierende Sequenz der HNF4-Bindestelle mit einer TATA-Box und der Transkriptionsstartstelle aufweist, so dass der Bereich von -278bp bis -215bp des HNF1 $\alpha$  Promotors vorliegt, wurde mit dem GFP-Reporter fusioniert und in *Xenopus* untersucht (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Minimales Promotorkonstrukt (-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen.** Die schematische Darstellung zeigt den Bereich von -278bp bis -215bp des *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotors. Die Positionen beziehen sich auf die Distanz zur Translationsstartstelle (ATG). Die HNF4-Bindestelle sowie die Transkriptionsstartstelle sind dargestellt. Das minimale Promotorfragment wird zur Regulierung des Reportergens GFP verwendet. Die bakterielle Plasmidsequenz, die zur Klonierung benötigt wird, ist nicht gezeigt. Um Einflüsse dieser Plasmidsequenz auszuschalten, wurde das Promotorkonstrukt mit zwei NotI-Schnittstellen flankiert, so dass dem Transgen die für die Klonierung notwendigen bakteriellen Sequenzen fehlen.

39 *Xenopus laevis* Larven, bei denen Kopf und Schwanz eindeutig identifizierbar waren, wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bei keiner dieser Larven konnte eine Expression des Reportergens GFP beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob sich bei einem Teil dieser Larven das Transgen dennoch nachweisen lässt, obwohl es nicht exprimiert wird, wurde in Stadium 59 von 13 Larven die Schwanzspitze abgeschnitten und die genomische DNA extrahiert. Mittels PCR wurden die Larven hinsichtlich des Reportergens GFP untersucht. Die Abbildung 26 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. In der genomischen DNA von vier der 13 untersuchten Larven lässt sich der GFP-Reporter detektieren.



**Abbildung 26: Charakterisierung des minimalen Promotorkonstruktes (-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP in *Xenopus laevis*.** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze von *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein 116bp

großes Fragment des Reportergens GFP. Als Positivkontrolle wurde ein GFP-Fragment aus (-278/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA amplifiziert. Als Negativkontrolle diente genomische DNA aus einer nicht-injizierten Kontrolllarve. Die Qualität der PCR wurde anhand der H<sub>2</sub>O-Kontrolle überprüft.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Von 39 in verschiedenen Entwicklungsstadien analysierten Larven zeigte keine Larve unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Expression des Reportergens GFP. In der genomischen DNA von vier von 13 untersuchten Larven konnte der GFP-Reporter mittels PCR nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses minimale Promotorfragment, bestehend aus einer HNF4-Bindestelle des HNF1 $\alpha$  Gens und der 3'-flankierenden Sequenz der HNF4-Bindestelle als basalem Promoter, nicht ausreichend ist, um eine Expression des GFP-Reporters zu steuern.

**Tabelle 8: Charakterisierung des minimalen Promotorkonstruktes (-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP in *Xenopus laevis*.** Die Larven wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem GFP-spezifischen Filterset hinsichtlich einer Expression des Reportergens GFP analysiert. Das Vorhandensein des Transgens wurde durch PCR der genomischen DNA dieser Tiere mit einem Primerpaar spezifisch für ein Fragment des GFP-Reporters untersucht.

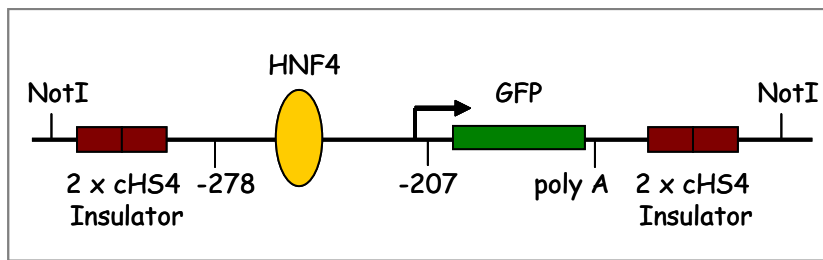
Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)	
				$\Sigma$ Fluoreszenz-analyse	$\Sigma$ PCR genomische DNA
<b>(-278/-215)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	5760	423	39	0/39	4/13

### 3.10.2 EIN FLANKIEREN DIESER HNF4-BINDESTELLE MIT INSULATOREN HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION IN XENOPUS

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Flankieren des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorelementes (-594/-58) mit Insulatoren in einer korrekten Expression des Transgens sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben erfolgt (Kapitel 3.5). Auch die mit dem kurzen Promotorkonstrukt beobachtete Mosaikexpression transgener Larven in frühen Entwicklungsstadien wurde durch Insulatoren stark eingeschränkt.

Es sollte daher in weiteren Experimenten untersucht werden, ob Insulatoren auch die Spezifität dieses minimalen Promotorelementes so beeinflussen können, dass es die

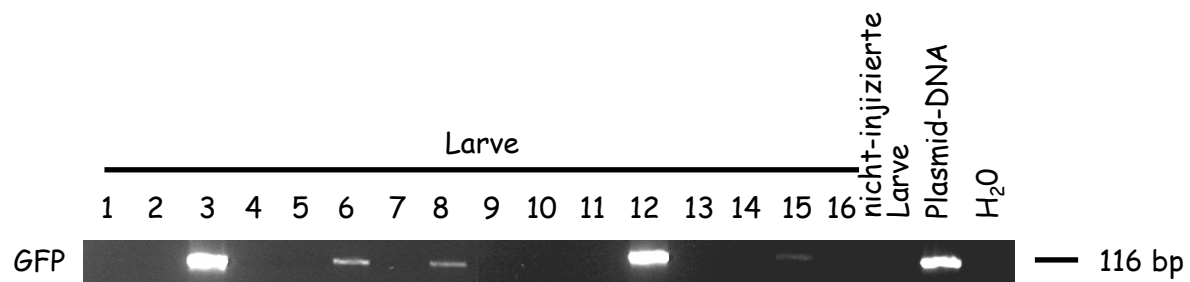
Expression des GFP-Reporters steuern kann. Dazu wurde das Promotorkonstrukt (-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP mit je zwei Kopien des 1,2kb Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns flankiert (Abbildung 27) und als Transgen in *Xenopus* eingebracht.



**Abbildung 27: Promotorkonstrukt Ins(-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen.** Jeweils zwei Kopien des 1,2kb Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns flankieren das minimale (-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukt. Weitere Erklärungen sind in Abbildung 25 aufgeführt.

25 Larven zeigten eine normale Kopf-Schwanz-Differenzierung und konnten in verschiedenen Entwicklungsstadien unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Bei keiner dieser Larven konnte eine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden.

Die Abbildung 28 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR, die mittels eines GFP-spezifischen Primerpaares von der genomischen DNA isoliert aus der Schwanzspitze von 16 Larven durchgeführt wurde, um zu überprüfen, ob bei einem Teil dieser Larven das Transgen dennoch nachgewiesen werden kann. In der genomischen DNA der untersuchten Larven 3, 6, 8, 12 und 15 konnte der GFP-Reporter detektiert werden.



**Abbildung 28: Charakterisierung des mit Insulatoren flankierten minimalen Promotorkonstruktes Ins(-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP in *Xenopus laevis*.** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR genomischer DNA isoliert aus der Schwanzspitze von *Xenopus laevis* Larven in Stadium 59. Die PCR erfolgte mittels eines Primerpaares spezifisch für ein 116bp großes Fragment des Reportergens GFP. Als Positivkontrolle wurde ein GFP-Fragment aus Ins(-278/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Plasmid-DNA amplifiziert. Als Negativkontrolle diente genomische DNA aus einer nicht-injizierten Kontrolllarve. Die Qualität der PCR wurde anhand der H<sub>2</sub>O-Kontrolle überprüft.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Obwohl bei keiner der 25 unter dem Fluoreszenzmikroskop analysierten Larven eine Expression von GFP beobachtet werden konnte, ließ sich bei einem Teil dieser Tiere das Transgen nachweisen. Auch ein Flankieren des Promotorfragmentes mit Insulatoren reicht folglich nicht aus, damit dieses minimale Promotorfragment eine Expression von GFP steuern kann.

**Tabelle 9: Charakterisierung des mit Insulatoren flankierten minimalen Promotorkonstruktes Ins(-278/-215)HNF1 $\alpha$ GFP in *Xenopus laevis*.** Die Larven wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem GFP-spezifischen Filterset hinsichtlich einer Expression des Reportergens GFP analysiert. Das Vorhandensein des Transgens wurde durch PCR der genomischen DNA dieser Tiere mit einem Primerpaar spezifisch für ein Fragment des GFP-Reporters untersucht.

Reporterkonstrukt	Injizierte Eier	Gefurchte Eier	Lebende Larven	Transgene Larven (GFP)	
				$\Sigma$ Fluoreszenz- analyse	$\Sigma$ PCR genomische DNA
<b>Ins(-278/-215)HNF1<math>\alpha</math>GFP</b>	4300	324	25	0/25	5/16

## 4 DISKUSSION

### 4.1 ENDOGENES HNF1 $\alpha$ WIRD IN *XENOPUS LAEVIS* LARVEN IN MESODERMALEN UND ENTODERMALEN GEWEBEN EXPRIMIERT

Bei der Charakterisierung der Expression des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  konnte das Protein bei *Xenopus laevis* in der frühen Larvalentwicklung in Pronephros, Leber und Darm nachgewiesen werden (Bartkowski et al., 1993). Bei Säugern wird HNF1 $\alpha$  in Niere, Leber, Magen, Darm und Pankreas exprimiert (Baumhueter et al., 1990; Blumenfeld et al., 1991; De Simone et al., 1991). Das HNF1 $\alpha$  Gen spielt bei Säugern im Pankreas eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der  $\beta$ -Zellen und ist für die Transkription des Insulin Gens essentiell. Eine heterozygote Mutation im HNF1 $\alpha$  Gen führt beim Menschen zu Maturity onset diabetes of the young (MODY), einer autosomal dominant vererbten, monogenen Form des nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus (Owen and Hattersley, 2001). Charakteristisch für MODY ist das frühe Ausbrechen der Krankheit, meist vor dem 25. Lebensjahr. Es besteht die Annahme, dass die Hauptursache der Krankheit in einer Störung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas liegt. Diese Störung zeigt sich in einer unzureichenden Insulinsekretion bei erhöhtem Glukosespiegel im Blut. Bislang konnten sechs Gene identifiziert werden, in denen heterozygote Mutationen zu MODY führen. Während eine Mutation von HNF1 $\alpha$  zu MODY3 führt, ist bei MODY1 das HNF4 $\alpha$  Gen betroffen. Weitere MODY Gene sind die Glucokinase (GCK; MODY2), IPF ("Insulin Promoter Factor 1"; MODY4), HNF1 $\beta$  (MODY5) und NeuroD1 (MODY6). Von diesen sechs MODY-Typen ist MODY3 mit etwa 65% die häufigste MODY-Form (Mitchell and Frayling, 2002).

Es wurde daher überprüft, ob HNF1 $\alpha$  bei *Xenopus* auch im Pankreas exprimiert wird. Neben der fehlenden Erkenntnis über die Expression von HNF1 $\alpha$  im Pankreas lagen auch keine Erkenntnisse hinsichtlich einer Expression von HNF1 $\alpha$  im Mesonephros vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HNF1 $\alpha$  ebenso wie in frühen Entwicklungsstadien von *Xenopus* Larven unmittelbar vor der Metamorphose in Leber und Darm exprimiert wird. Zusätzlich konnte das Gen im Mesonephros und im Pankreas nachgewiesen werden (Abbildung 2). Das Expressionsmuster des endogenen HNF1 $\alpha$  Gens entspricht demnach demjenigen bei Säugern.



## 4.2 HNF1 $\alpha$ PROMOTORANALYSEN IN TRANSGENEN XENOPUS

Die Identifizierung regulatorischer Elemente bei Vertebraten ist mit Transfektionen von Genkonstrukten in unterschiedlich differenzierte Zellen nur ungenügend möglich. So konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass transiente Transfektionsexperimente für die Analyse regulatorischer Elemente des HNF1 $\alpha$  Promotors, welche für eine gewebespezifische Expression verantwortlich sind, nicht geeignet waren (Abbildung 20). Als wesentlich aussagekräftiger hat sich das Einbringen von Genkonstrukten als Transgen in den ganzen Organismus erwiesen. Mit dieser Methode sind insbesondere in der Maus eine Vielzahl von Promotoren identifiziert und charakterisiert worden, die eine Expression von Reportergenen zeitlich und räumlich korrekt regulieren (Kulkarni and Okada, 2002; Pondel et al., 2002). Der zeitliche Aufwand bei der Charakterisierung der Expression eines Promotorkonstruktes mit Hilfe transgener Mäuse ist jedoch enorm und erfordert zusätzlich eine große tierexperimentelle Infrastruktur. Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* stellte daher eine attraktive Alternative dar, um eine effiziente Analyse regulatorischer Elemente an transgenen Tieren durchzuführen. Ein weiterer Vorteil transgener *Xenopus* Larven besteht darin, dass die Entwicklung der Larven ausserhalb des Muttertieres erfolgt. Zusammen mit der Transparenz dieser Larven ergab sich so die Möglichkeit, im Verlauf dieser Arbeit die Expression unterschiedlicher HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukte an 125 transgenen Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien am lebenden Tier untersuchen zu können. Die Analyse einer so großen Anzahl transgener Tiere im Rahmen dieser Arbeit wäre mit Hilfe des Maussystems nicht möglich gewesen. Durch die schnelle Entwicklungszeit der *Xenopus* Larven konnten die Tiere bereits wenige Tage nach der Injektion unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich einer Expression des Reportergens GFP untersucht werden. Dadurch war es möglich, relativ schnell auf die Ergebnisse der Expression einzelner HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukte zu reagieren und neue Konstrukte unter diesem Gesichtspunkt herzustellen.

### 4.3 EIN LANGES HNF1 $\alpha$ PROMOTORFRAGMENT IST FÜR EINE GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION IN TRANSGENEN XENOPUS ESSENTIELL

Um die Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotors in transgenen *Xenopus laevis* Larven untersuchen zu können, wurden unterschiedliche Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente mit dem Reportergen GFP fusioniert und als Transgen in den Organismus integriert. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Fragment des HNF1 $\alpha$  Promotors, welches einen Bereich von -5949bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst, sowohl im mesodermalen Pronephros als auch in den entodermalen Geweben Darm und Leber exprimiert wird (Ryffel and Lingott, 2000). In diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht die Expression des Transgens im Pankreas analysiert. Um die Expression des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP im Pankreas in transgenen Larven analysieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit erneut transgene *Xenopus laevis* Larven mit diesem Promotorkonstrukt hergestellt. Das Transgen konnte mittels PCR von genomischer DNA isoliert aus Larven, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop als transgene Larven identifiziert wurden, nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Die Larven wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien der frühen Larvalentwicklung (Stadium 35-45) unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem GFP-spezifischen Filterset hinsichtlich der Expression dieses Reportergens analysiert. Die Analyse dieser Larven zeigte eine Expression von GFP sowohl im Pronephros als auch in Darm und Leber, konnte folglich die Ergebnisse der früheren Untersuchungen bestätigen (Abbildung 4, Tabelle 1). Bei keiner der 22 transgenen Larven konnte eine Expression von GFP im Pankreas beobachtet werden. Neben der Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde das Expressionsprofil des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in transgenen Xenopus Larven auch mittels RT-PCR untersucht werden. Die Möglichkeit, das Expressionsmuster des Transgens von Larven in Stadium 35-45 mittels RT-PCR zu untersuchen, bestand nicht, da aufgrund der Größe der einzelnen Gewebe nicht genügend Material zur Verfügung stand, um die für eine RT-Reaktion benötigte RNA-Menge isolieren zu können. Daher wurde die gewebespezifische Expression des Promotorkonstruktes an freischwimmenden Larven unmittelbar vor der Metamorphose (Stadium 59) mit einem Primerpaar spezifisch für ein Fragment von GFP analysiert (Abbildung 5B). Neben einer Expression von GFP in den entodermalen Geweben Darm und Leber ließ sich eine Expression des Reportergens im Mesonephros nachweisen. Obwohl die

transgenen Larven unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Expression von GFP im Pankreas zeigten, ließ sich mittels RT-PCR ein GFP-positives Signal nachweisen. Dieses Ergebnis lässt sich einerseits dadurch erklären, dass die PCR im Vergleich zur Fluoreszenzanalyse eine Methode darstellt, die wesentlich sensitiver ist, was bedeuten könnte, dass der GFP-Reporter im Pankreas mittels RT-PCR zwar detektiert werden kann, die Transkriptmenge jedoch nicht ausreicht, um in der Fluoreszenzanalyse nachgewiesen zu werden. Desweiteren muss bedacht werden, dass die Fluoreszenzanalyse an frühen Entwicklungsstadien durchgeführt wurden, während die Analyse der Expression mittels RT-PCR an Larven unmittelbar vor der Metamorphose erfolgte, also etwa vier bis fünf Wochen später. Es könnte folglich sein, dass das Reportergen im Pankreas erst in späteren Entwicklungsstadien exprimiert wird.

Die Ergebnisse der Analyse des Expressionsmusters des als Transgen untersuchten HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-5949/-58) bestätigen einerseits die früheren Daten, nach welchen eine Aktivität von GFP im Pronephros, im Darm und in der Leber nachgewiesen werden kann. Mittels RT-PCR ließ sich zusätzlich eine Expression von GFP im Pankreas und im Mesonephros detektieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) ausreichend ist, um eine korrekte Expression des Transgens zu steuern. Das Expressionsprofil des Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP entspricht demjenigen des endogenen HNF1 $\alpha$  Gens.

#### **4.4 EIN KURZES HNF1 $\alpha$ PROMOTORFRAGMENT KANN KEINE GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION IN TRANSGENEN XENOPUS STEUERN**

Im Gegensatz zum langen (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP Promotorkonstrukt ist ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment, welches einen Bereich von -594bp bis -58bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst, nicht ausreichend, um eine gewebespezifische Expression in entodermalen Geweben zu steuern. Die Analyse der Larven, welche das Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen aufwiesen (Abbildung 9A), unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Filterset spezifisch für GFP erbrachte eine Expression des Reportergens, welche vornehmlich auf den mesodermalen Pronephros beschränkt war (Abbildung 7). Während 78% der transgenen Larven eine Expression von GFP im Pronephros zeigten, ließ sich nur bei 13% der Larven eine zusätzliche Expression von GFP in

entodermalen Geweben wie Darm und Leber nachweisen (Tabelle 2). Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) auf den mesodermalen Pronephros beschränkt ist. Neben dieser mesodermalen Expression konnte bei diesen Analysen in frühen Entwicklungsstadien (Stadium 20-28) eine schwache allgemeine Expression des Transgens beobachtet werden. Zusätzlich wurde bei einigen Larven eine Expression des Transgens im Auge beobachtet (Ryffel and Lingott, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte weder die diffuse Expression des Transgens in frühen Entwicklungsstadien noch die ektopische Expression des Transgens im Auge detektiert werden. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass in dieser Arbeit nur eine Stichprobe von 23 Larven analysiert wurde. Neben der Analyse der transgenen Larven unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes in transgenen Larven unmittelbar vor der Metamorphose mittels RT-PCR mit einem Primerpaar spezifisch für GFP untersucht. Auch mit dieser Methode ließ sich in Larven älterer Entwicklungsstadien eine Expression von GFP in entodermalen Geweben wie Darm, Leber oder Pankreas nicht nachweisen (Abbildung 9B). Die Expression des kurzen Promotorfragmentes war auf den mesodermalen Mesonephros beschränkt.

Darüber hinaus ist die Expression des kurzen Promotorkonstruktes häufig mit einer Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen assoziiert (Abbildung 8). Bei 56% der transgenen Larven ließ sich in frühen Entwicklungsstadien eine Mosaikexpression detektieren (Tabelle 2). Diese Mosaikexpression weist einen transienten Charakter auf, da diese fluoreszierenden Einzelzellen im Laufe der Larvalentwicklung verschwanden und in Stadium 45 nicht mehr beobachtet werden konnten. Die transiente Form der Mosaikexpression konnte auch schon bei der früheren Analyse transgener *Xenopus* Larven detektiert werden, welche das kurze HNF1 $\alpha$  Promotorfragment als Transgen aufwiesen (Ryffel and Lingott, 2000). Da sich das Phänomen der Mosaikexpression auch bei einer Injektion von DNA in befruchtete *Xenopus* Eier beobachten lässt, wäre eine mögliche Erklärung für die transiente Form dieser Mosaikexpression, dass die GFP-Fluoreszenz dieser Zellen auf nicht-integrierte Reporter-DNA zurückzuführen ist, welche zusammen mit integrierter DNA in die unbefruchteten Eier transplantiert wird. Dies würde allerdings nicht die Tatsache erklären, warum die Mosaikexpression bei einem kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) häufiger auftritt als bei einem langen HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58). Einen weiteren Erklärungsansatz für die häufige Mosaikexpression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorkonstruktes bietet die Positioneffekt-Variegation („Position Effect Variation“, PEV). Das Phänomen der PEV wurde erstmals im Jahre 1930 beschrieben,

nachdem nach einer Röntgenstrahlmutagenese Fliegen isoliert werden konnten, welche eine mosaikartig gefleckte Rotfärbung der Augen aufwiesen (Muller, 1930). Die Augenfarbe von *Drosophila* wird durch das Expressionslevel des Gens „white“ unmittelbar beeinflusst. Während eine schwache Expression des Gens in einem Phänotyp der Fliegen mit hellgelben Augen resultiert, hat eine starke Genexpression eine rote Augenfarbe zur Folge. Der rot-gelb gefleckte Augentyp ist auf X-chromosomale Inversionen zurückzuführen, bei denen die eine Bruchstelle unmittelbar neben dem „white“ *locus* liegt und die andere im Heterochromatin des X-Chromosoms. Dadurch wird das „white“ Gen in einigen Zellen exprimiert, während es in anderen Zellen inaktiv bleibt, was zum Phänotyp der Mosaikexpression führt (Schulz, 1936). Durch Boundary Elemente, welche an den genomischen Grenzen zwischen Euchromatin und Heterochromatin vorhanden sind, werden die beiden Chromatintypen normalerweise stabil voneinander abgegrenzt. Diese Grenzelemente verhindern so ein Übergreifen der Heterochromatisierung ins angrenzende Euchromatin. Wenn diese nach einer Chromosomenumlagerung an den Übergangsstellen fehlen, können sich die heterochromatischen Domänen in das Euchromatin ausdehnen.

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass Insulatoren, welche an den Grenzen von Gendomänen lokalisiert sind, Variegationseffekte unterdrücken können. So konnte gezeigt werden, dass der bekannte  $\beta$ -Globin Insulator 5'-HS4 des Huhns die Expression eines Tyrosinase Transgens in transgenen Mäusen beeinflussen kann. In der Abwesenheit von Insulatoren lässt sich eine hohe Variabilität in der Fellfarbe einzelner Stammtiere beobachten, die von weiß bis dunkelgrau rangiert. Ein Flankieren des Transgens mit Insulatoren bewirkt, dass die Stammtiere eine nahezu einheitliche graue Fellfarbe aufweisen (Potts et al., 2000). Darüber hinaus können Insulatoren des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns auch die Variegation der Expression eines Anionenaustauscherproteins (EA1) deutlich reduzieren (Frazar et al., 2003).

#### **4.5 DIE 5'-GRENZE DES HNF1 $\alpha$ PROMOTORS, DER EINE GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VERMITTELT, LIEGT STROMAUFWÄRTS VON POSITION -2269BP**

Durch das Einbringen verschiedener HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukte mit Deletionen zwischen den Positionen -5949bp und -594bp konnte der regulatorische Bereich kartiert werden, der für eine korrekte Expression essentiell ist. Während die HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente

(-3932/-58) und (-2589/-58) sowohl im mesodermalen Pronephros als auch in entodermalen Geweben wie Darm und Leber exprimiert werden, und somit eine gewebespezifische Expression des Transgens vermitteln können, ist ein kürzeres HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-2269/-58) nicht ausreichend, um eine korrekte Expression des Transgens zu steuern (Abbildung 14). Die Expression dieses Promotorfragmentes ist vorwiegend auf den mesodermalen Pronephros beschränkt. Nur bei 13% der transgenen Larven ließ sich eine zusätzliche Expression von GFP in entodermalen Geweben wie Darm und Leber beobachten (Tabelle 5). Ebenso wie bei dem kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) konnten bei diesem Promotorkonstrukt vielfach GFP-fluoreszierende Einzelzellen detektiert werden. 22% der Larven, welche das Promotorkonstrukt (-2269/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen aufwiesen, zeigten eine Mosaikexpression in frühen Stadien der Larvalentwicklung (Tabelle 5).

Der Verlust der entodermalen Expression und die häufig auftretende Mosaikexpression der kürzeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente deuten darauf hin, dass stromaufwärts von der Position -2269bp des HNF1 $\alpha$  Promotors die 5'-Grenze einer regulatorischen Sequenz liegt, welche den Promotor des Transgens von umliegenden Regulationselementen der Integrationsstelle isolieren kann, und so für eine korrekte Expression des Transgens verantwortlich ist. Durch den Verlust eines solchen Regulationselementes in den kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmenten (-2269/-58; -594/-58) kommt es zu einer Beeinflussung der Expression des Transgens durch umliegende Regulationselemente.

## **4.6 EIN REGULATORISCHER INSULATOR IM XENOPUS HNF1 $\alpha$ PROMOTOR**

Regulationselemente, welche die korrekte Expression der Gene innerhalb einer Domäne über deren Abschirmung vom umliegenden Chromatin gewährleisten, so dass nur innerhalb der Domäne gelegene *cis*-regulatorische Elemente wirken können, werden als Insulatoren bezeichnet (West et al., 2002).

#### 4.6.1 EIN INSULATOR IM XENOPUS HNF1 $\alpha$ PROMOTOR SCHÜTZT VOR CHROMOSOMALEN POSITIONSEFFEKTEN

Um zu untersuchen, ob der Verlust der entodermalen Expression des Transgens und die häufig auftretende Mosaikexpression auf den Verlust eines regulatorischen Insulators zurückzuführen ist, wurde der Einfluß des Vertebraten-Insulators 5'-HS4 des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns auf die Spezifität der Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) analysiert. Dazu wurde das kurze Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit je zwei Kopien des 1,2kb Insulators des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns flankiert und als Transgen in *Xenopus laevis* untersucht. Transgene Larven, welche das Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen aufwiesen (Abbildung 17A), zeigten bei einer Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop neben einer Expression von GFP im mesodermalen Pronephros eine zusätzliche Expression des Transgens in entodermalen Geweben wie Darm und Leber (Abbildung 16, Tabelle 6). Ein Flankieren des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes mit Insulatoren des  $\beta$ -Globin-Gens ermöglicht folglich eine Expression des Reportergens in entodermalen Geweben, so dass das Expressionsmuster des insulierten Promotorkonstruktes Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP demjenigen des langen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-5949/-58) mit einer Expression sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben entspricht. Die Analyse des Expressionsprofils dieser transgenen Larven unmittelbar vor der Metamorphose mittels RT-PCR verschiedener Gewebe zeigte ebenfalls, dass das Expressionsmuster des insulierten Promotorkonstruktes Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP mit demjenigen des langen Promotorkonstruktes (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP übereinstimmt (Abbildung 17B). Darüberhinaus verringern Insulatoren die Häufigkeit einer Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen. Während 56% der transgenen Larven, welche das uninsulierte Promotorkonstrukt (-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen aufwiesen, unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Mosaikexpression aufwiesen, konnte diese nur bei 7% der transgenen Larven beobachtet werden, welche das insulierte Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP als Transgen enthielten (Abbildung 18, Tabellen 2 und 6).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im HNF1 $\alpha$  Promotor ein regulatorisches Insulatorelement liegt, welches für die korrekte Expression des Transgens verantwortlich ist. Die Analyse unterschiedlicher HNF1 $\alpha$  Promotorkonstrukte mit Deletionen zwischen den Positionen -5949bp und -594bp zeigte, dass die 5'-Grenze dieses Elementes stromaufwärts

von Position -2269bp lokalisiert ist (Kapitel 4.5). Die korrekte Expression des Transgens wird in den längeren HNF1 $\alpha$  Promotorfragmenten (-5949/-58; -3932/-58; -2589/-58) vermutlich dadurch gewährleistet, dass dieses Insulatorelement den Promotor des Transgens von umliegenden Regulationselementen der Integrationsstelle abschirmen kann, und so zum einen eine entodermale Expression des Transgens ermöglicht und zum anderen Variegationseffekte unterbinden kann.

Eine Möglichkeit, den Insulator des HNF1 $\alpha$  Promotors besser zu charakterisieren, bestünde darin, in zukünftigen Experimenten den Einfluß der entsprechenden Sequenz des HNF1 $\alpha$ , in welcher der Insulator vermutet wird (-2589/-2269), auf die Expression des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) in transgenen *Xenopus* Larven zu analysieren. Je nach Ergebnis könnte die entsprechende Sequenz zusätzlich verändert werden. Falls das Konstrukt keine korrekte Expression sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben vermittelt, müsste ein größeres Fragment des HNF1 $\alpha$  Promotor eingesetzt werden, welches anschließend verkleinert werden würde. Falls das Konstrukt funktioniert, müssten weitere Vereinfachungen vorgenommen werden, um die genaue Position des Insulators kartieren zu können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zwar, dass Insulatoren den HNF1 $\alpha$  Promotor vor chromosomalen Positionseffekten und somit vor Einflüssen des umliegenden Chromatins schützen können, dennoch wird deutlich, dass diese Regulationselemente die Einflüsse nicht immer unterbinden können. Sowohl mit dem langen HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) als auch mit dem insulierten Promotorkonstrukt Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP ließen sich vereinzelt Larven detektieren, bei welchen das Transgen nur in einigen Geweben exprimiert wird oder bei welchen in frühen Stadien der Larvalentwicklung eine Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen detektiert werden konnte.

Bereits in früheren Studien wurde der Einfluss von Insulatorelementen auf die korrekte Expression eines Transgens beschrieben. So konnte in einer von Potts et al. im Jahre 2000 veröffentlichten Arbeit gezeigt werden, dass ein 1,2kb großes Fragment des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns (5'-HS4) Variegationseffekte in der Expression eines Tyrosinase Transgens in transgenen Mäusen vermindern kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen zwar deutlich, dass es durch eine Deletion des Insulatorelementes im HNF1 $\alpha$  Promotor zu einer Beeinflussung der Genexpression durch umliegende Regulationselemente der Integrationsstelle kommen kann, was in einem Aktivitätsverlust des Reportergens in entodermalen Geweben und einer häufig auftretenden Mosaikexpression resultiert, über den Mechanismus, wie der Insulator im HNF1 $\alpha$  Promotor



die Expression des Transgens vor chromosomalen Positionseffekten schützen kann, lässt sich jedoch keinerlei Aussage machen. Auch die Funktionsweise verschiedener bislang charakterisierter Insulatoren ist noch nicht komplett verstanden und lässt sich nicht in einem einzigen Modell zusammenfassen (Bell et al., 1999; Bell et al., 2001). Einige Insulatoren üben ihre Effekte auf die Transkription der Gene offensichtlich über eine Beeinflussung der Chromatinstruktur aus. Der wohl am besten beschriebene Insulator des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns (5'-HS4) zeigt zum Beispiel starke DNaseI-Hypersensitivität und trennt in Erythrozyten den  $\beta$ -Globin-Genlocus, der in diesen Zellen transkriptionell aktiv ist, von einer Region stark kondensierten Chromatins (Prioleau et al., 1999). Es wird vermutet, dass der Insulator die Ausbreitung dieser repressiven Chromatinstruktur über Histonacetylierung verhindert, da er mit Histonacetyltransferaseaktivität assoziiert zu sein scheint (Litt et al., 2001). Andere Insulatoren sind an der Organisation einer Schlaufenstruktur des Chromatins beteiligt. Der gypsy Insulator von *Drosophila*, welcher auch Matrixbindung zeigt, beeinflusst die subnukleäre Organisation der DNA. Die an den Insulator bindenden Proteine Su(Hw) und Mod(mgd4) lagern sich im Interphasekern an der Kernlamina zu ca. 20-25 Clustern zusammen und organisieren so die zwischen ihnen liegende DNA-Sequenz in Schlaufen (Gerasimova et al., 2000). Es ist denkbar, dass die DNA im Interphasekern durch Interaktion von DNA-bindenden Proteinen untereinander und mit strukturellen Komponenten wie der Kernmatrix in Schlaufen mit unabhängiger Genregulation organisiert ist (Bell et al., 2001). Wahrscheinlich ist diese Organisation Voraussetzung für die korrekte Expression von Genen. Kürzlich konnte am Beispiel des humanen Apolipoprotein B Gens gezeigt werden, dass Insulatoren im Zusammenspiel mit nahe gelegenen S/MAR-Elementen durch unterschiedliche Schlaufenbildung in Leber und Dünndarm eine gewebespezifische Genexpression gewährleisten (Antes et al., 2001).

#### **4.6.2 „ENHANCER BLOCKING“ AKTIVITÄT DES XENOPUS HNF1 $\alpha$ PROMOTORS**

Neben der oben beschriebenen Fähigkeit, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen, werden Insulatoren durch ihre Fähigkeit charakterisiert, bei einer Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer blockieren zu können (West et al., 2002). Die „Enhancer Blocking“-Aktivität eines Insulatorelementes wurde ursprünglich durch stabile Transformation in Zellen oder Organismen untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass ein 1,2kb langes Fragment des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns (5'-HS4) die Expression eines Reportergens für

Neomycinresistenz in K562-Zellen reduzieren kann, wenn dieses zwischen einem humanen  $\gamma$ -Globin Promotor und einem stromaufwärts gelegenen Enhancer des Maus  $\beta$ -Globin-Genlocus lokalisiert ist (Chung et al., 1993). Es zeigte sich, dass eine doppelte Kopie dieses Fragmentes auf jeder Seite des Enhancers für eine vollständige Insulatoraktivität benötigt wird. Die „Enhancer Blocking“ Aktivität des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns kann auch in transienten Transfektionsexperimenten analysiert werden (Recillas-Targa et al., 1999). Die Analyse von Regulationselementen in transienten Transfektionsexperimenten ist besonders attraktiv, da sie wesentlich weniger Zeit und Aufwand benötigt als eine gleichwertige Untersuchung dieser Elemente in stabilen Transfektionen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Fähigkeit des  $\beta$ -Globin Insulators, die Interaktion von SV40 Enhancer und SV40 Promotor in transienten Transfektionsexperimenten zu blockieren, auch für die Zelllinien HeLa, HEK293 und FT02B (Abbildung 21) gezeigt werden. Es zeigte sich, dass ebenso wie in der vorherigen Untersuchung an erythroiden 6C2-Zellen und QT6-Fibroblastenzellen bei Transfektion eines circulären Plasmids eine Flankierung des Enhancers mit je zwei Kopien des  $\beta$ -Globin Insulators (Ins-pGL3-Ins) nötig ist, damit die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer blockiert werden kann. Eine Lokalisierung einer doppelten Kopie des Insulatorelementes auf nur einer Seite des Enhancers (pGL3-Ins) erbrachte keinen Einfluß auf die Interaktion von Enhancer und Promotor. In einem circulären Plasmid, in dem der Enhancer nur auf einer Seite von einem Insulatorelement begrenzt wird, kann der Enhancer den Promotor von der entgegengesetzten Seite, welche nicht von Insulatoren begrenzt wird, aktivieren. Eine Flankierung des Enhancers mit Insulatoren war daher auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit für eine vollständige Blockierung der Enhanceraktivität nötig.

Basierend auf dem für die Zelllinien HeLa, HEK293 und FT02B entwickelten Assay konnten die Reportergenkonstrukte HNF1 $\alpha$ (1-6)-pGL3-Ins hergestellt werden, in denen der SV40 Enhancer auf der einen Seite eine doppelte Kopie des  $\beta$ -Globin Insulators aufweist und auf der anderen Seite von überlappenden Fragmenten des HNF1 $\alpha$  Promotors begrenzt wird (Abbildung 22). Die unterschiedlichen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente konnten so in transienten Transfektionsexperimenten hinsichtlich ihrer „Enhancer Blocking“ Aktivität untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass zwei überlappende HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente (Fragment 1: -4036bp bis -3215bp; Fragment 2: -3338bp bis -2517bp) die Interaktion zwischen Promotor und Enhancer reduzieren können (Abbildung 23). Während das HNF1 $\alpha$  Promotorfragment 1 die Interaktion zwischen Enhancer und Promotor ebenso wie der  $\beta$ -Globin Insulator des Huhns vollständig blockieren kann, ist die „Enhancer Blocking“

Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes 2 geringer. Dies deutet darauf hin, dass die Insulatoraktivität des HNF1 $\alpha$  Promotors, welche für die „Enhancer Blocking“ Aktivität verantwortlich ist, in einem Bereich von Position -4036bp bis -3215bp lokalisiert ist, so dass das entsprechende Promotorfragment 1 die Interaktion von Enhancer und Promotor vollständig unterbinden kann. Die geringere Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes 2 gibt Hinweise darauf, dass ein Teil der Insulatoraktivität auch in diesem Bereich lokalisiert sein könnte. Da die analysierten Promotorfragmente in einem Bereich von 123bp überlappen, könnte die geringere Aktivität auch dadurch zu erklären sein, dass der Effekt mit dem im überlappenden Bereich zwischen den Positionen -3338bp und -3215bp lokalisierten Insulatorelement assoziiert ist. Die übrigen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente 3-6, welche einen Bereich des HNF1 $\alpha$  Promotors von -2640bp bis -259bp relativ zur Translationsstartstelle umfassen, können die Interaktion von Enhancer und Promotor nicht blockieren.

#### **4.6.3 POTENTIELLE CTCF-BINDESTELLEN IM HNF1 $\alpha$ PROMOTOR STROMAUFWÄRTS VON POSITION -2269BP**

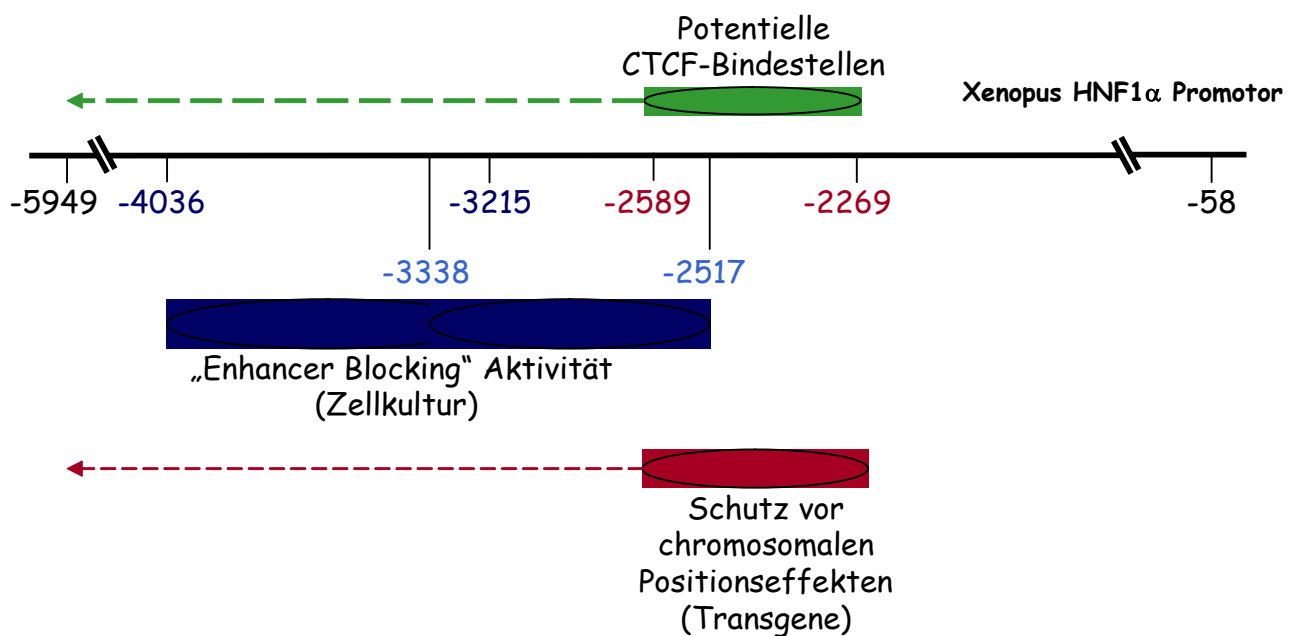
Für die „Enhancer Blocking“ Aktivität des  $\beta$ -Globin Insulators und anderer Vertebraten-Insulatoren des Huhns sind Bindestelle für den multivalenten Transkriptionsfaktor CTCF notwendig (Geyer and Clark, 2002). Im HNF1 $\alpha$  Promotor konnten potentielle CTCF-Bindestellen identifiziert werden, welche stromaufwärts von Position -2269bp lokalisiert sind (Abbildung 24). Die Analyse von Bindestellen mit Kompetitionsexperimenten ist jedoch relativ ungenau. Zur besseren Analyse von CTCF-Bindestellen im HNF1 $\alpha$  Promotor könnten daher in zukünftigen Gelretardationsanalysen verschiedene Fragmente des HNF1 $\alpha$  Promotors hinsichtlich einer Bindestelle für synthetisch hergestelltes CTCF analysiert werden. Da das Protein CTCF mit unterschiedlichen Anteilen seiner elf Zinkfinger 40-50bp lange DNA-Bereiche mit variabler Basenkomposition bindet, müssten die zu untersuchenden HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente in einem Bereich von mindestens 50-60bp überlappen.

#### **4.6.4 SCHUTZ VOR CHROMOSOMALEN POSITIONSEFFEKTEN UND „ENHANCER BLOCKING“ AKTIVITÄT DES XENOPUS HNF1 $\alpha$ PROMOTORS STELLEN SEPARATE AKTIVITÄTEN DAR**

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Insulatorelement im HNF1 $\alpha$  Promotor von *Xenopus* identifiziert werden. Ebenso wie der Insulator des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns weist der Insulator im HNF1 $\alpha$  Promotor die beiden klassischen Eigenschaften, Schutz vor chromosomalen Positionseffekten und „Enhancer Blocking“ Aktivität, auf, welche mit einer Beeinflussung der Genexpression durch Insulatoren assoziiert sind. Die 5'-Grenze eines regulatorischen Insulatorelementes, welches mit der Eigenschaft, das Transgen gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins zu schützen, verknüpft ist, konnte durch das Einbringen verschiedener HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente auf einen Bereich von -2589bp und -2269bp lokalisiert werden (Kapitel 4.5 und 4.6.1). Es kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass auch stromaufwärts von Position -2589bp regulatorische Insulatorelemente liegen, welche eine korrekte Expression des Transgens fördern. Mit Sicherheit kann jedoch ausgeschlossen werden, dass Insulatoren stromabwärts von Position -2269bp lokalisiert sind, da ein entsprechendes Promotorfragment (-2269/-58) für eine gewebespezifische Steuerung des Transgens nicht ausreichend ist. Neben diesem Schutz vor chromosomalen Positionseffekten weisen spezifische Fragmente des HNF1 $\alpha$  Promotors „Enhancer Blocking“ Aktivität auf (Kapitel 4.6.2). Die blockierende Wirkung der HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente auf die Interaktion von Enhancer und Promotor ist vornehmlich in einem Promotorfragment lokalisiert, welches einen Bereich von -4036bp bis -3215bp relativ zur Translationsstartstelle umfasst. Ein weiteres HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-3338/-2517) zeigt nur geringe „Enhancer Blocking“ Aktivität, welche auch in dem überlappenden Bereich der beiden Promotorfragmente lokalisiert sein könnte.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die klassischen Eigenschaften des HNF1 $\alpha$  Insulators, Schutz vor chromosomalen Positionseffekten und „Enhancer Blocking“ Aktivität, zwei separate Aktivitäten darstellen, die in verschiedenen Bereichen des Promotors lokalisiert sind (Abbildung 29). Auch für den Insulator des  $\beta$ -Globin-Gens des Huhns konnte gezeigt werden, dass diese beiden Eigenschaften separate Aktivitäten darstellen. Während die bekannte CTCF-Bindestelle FII im  $\beta$ -Globin Insulator als ein für die „Enhancer Blocking“ Aktivität essentielles und ausreichendes Element charakterisiert werden konnte, sind CTCF-Bindestellen für die Fähigkeit des Insulators, von Positionseffekten abzuschirmen, weder ausreichend noch notwendig (Recillas-Targa et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnten

potentielle CTCF-Bindestellen im HNF1 $\alpha$  Promotor stromaufwärts von Position -2269bp lokalisiert werden (Kapitel 4.6.3). Dies würde bedeuten, dass diese Bindestellen nicht wie im  $\beta$ -Globin Insulator des Huhns mit der „Enhancer Blocking“ Aktivität des HNF1 $\alpha$  Promotors assoziiert sind, sondern vielmehr in dem Bereich lokalisiert sind, welche mit der Fähigkeit des Insulators, vor Positionseffekten des umliegenden Chromatins zu schützen, verknüpft sind. Da die Existenz weiterer CTCF-Bindestellen stromaufwärts von Position -2589bp nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, besteht die Möglichkeit, dass auch hier Bindestellen für den multivalenten Transkriptionsfaktor liegen, welche mit der „Enhancer Blocking“ Aktivität assoziiert sind.



**Abbildung 29: Schutz vor chromosomalen Positionseffekten und „Enhancer Blocking“ Aktivität des Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotors stellen separate Aktivitäten dar.** Schematische Darstellung des Xenopus HNF1 $\alpha$  Promotors von Position -5949bp bis -58bp. Die Positionen beziehen sich auf die Distanz zur Translationsstartstelle (ATG). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Insulatorelemente des HNF1 $\alpha$  Promotors, welche mit der „Enhancer Blocking“ Aktivität und dem Schutz vor chromosomalen Positionseffekten assoziiert sind, sind angezeigt. Der Bereich des Promotors mit potentiellen CTCF-Bindestellen ist ebenfalls aufgeführt.

## 4.7 VERERBUNG TRANSGENER REPORTER-DNA

Die Vererbung der transgenen Plasmid-DNA über die Keimbahn und somit die stabile Integration des Transgens wurde an der F<sub>1</sub>-Generation eines transgenen Stammtieres untersucht, welches das Transgen Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP in Geweben mesodermalen und entodermalen Ursprungs exprimiert. Nach Mendel sollte ein transgenes Stamtier das Transgen an 50% der F<sub>1</sub>-Larven vererben. Dies lässt sich beobachten, sofern die Reporter-DNA an einem einzelnen chromosomalen *locus* integriert hat und dort auch aktiv ist. Bei zwei oder mehr Integrationsorten wird das Stamtier die transgene DNA hingegen auf über die Hälfte der Nachkommen übertragen. Für den Fall, dass die transgene DNA bereits im Stamtier an einem spezifischen Integrationsort durch Einflüsse des umliegenden Chromatins nicht aktiviert oder nachträglich stillgelegt wird, würde das Stamtier die Reporter-DNA an weniger als die Hälfte der F<sub>1</sub>-Nachkommen vererben.

Nur bei 25% der F<sub>1</sub>-Larven der Linie Ins(-594/-58)HNF1 $\alpha$ GFP konnte ein GFP-positives Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Tabelle 7). Die Daten zeigen, dass das Stamtier die Reporter-DNA stabil in das Genom integriert hat und an die nächste Generation vererbt. Die Tatsache, dass weniger als die Hälfte der Nachkommen das Transgen exprimieren, deutet darauf hin, dass bereits im Stamtier das Transgen an verschiedenen Stellen nicht aktiviert oder nachträglich stillgelegt wird. Dadurch könnte es sein, dass das Transgen zwar an eine größere Anzahl von Nachkommen übertragen wurde, es dort jedoch nicht exprimiert wird. Die Analyse der genomischen DNA der Nachkommen mittels PCR könnte Aufschluss darüber bringen, wie viele Larven das Transgen tatsächlich aufweisen.

Die transgenen F<sub>1</sub>-Larven zeigten ebenso wie das Stamtier eine Expression des Transgens im mesodermalen Pronephros und in den entodermalen Geweben Darm und Leber. Zusätzlich ließ sich bei acht der 57 transgenen Larven eine Expression des Transgens in einer scharf begrenzten Region des Gehirns beobachten (Abbildung 19A, Tabelle 7). Da eine Expression von HNF1 $\alpha$  im Gehirn mittels RT-PCR ausgeschlossen werden konnte (Kapitel 4.1), handelt es sich bei der Expression des Transgens im Gehirn um eine ektopische Expression. Diese ektopische Expression des Transgens im Gehirn ließ sich auch bei der Analyse der F<sub>1</sub>-Generation eines geschlechtsreifen Weibchens beobachten, welches das Promotorkonstrukt (-5949/-58)HNF1 $\alpha$ GFP offensichtlich an mehr als einem chromosomalen *locus* stabil exprimiert hat. Hier ließ sich bei 18 von 24 transgenen F<sub>1</sub>-Larven neben einer Expression in mesodermalen und entodermalen Geweben eine zusätzliche Expression des Transgens in dieser scharf begrenzten Region des Gehirns detektieren (Abbildung 19B, Tabelle 7).

## 4.8 EINE HNF4-BINDESTELLE DES HNF1 $\alpha$ PROMOTORS REICHT NICHT AUS, UM EINE EXPRESSION VON GFP ZU VERMITTELN

Während ein langes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) in transgenen *Xenopus laevis* Larven sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben exprimiert wird (Kapitel 4.3), ist ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) nicht ausreichend, um eine gewebespezifische Expression des Transgens zu steuern. Die Expression dieses kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes ist vornehmlich auf die mesodermale Niere beschränkt (Kapitel 4.4). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass für eine mesodermale Expression des HNF1 $\alpha$ GFP Transgens die HNF4-Bindestelle des HNF1 $\alpha$  Promotors notwendig ist. Eine Deletion dieser Bindestelle im HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) resultiert in transgenen *Xenopus* Larven in einem Verlust der Expression im mesodermalen Pronephros, während die Expression in entodermalen Geweben von der Deletion nicht beeinflusst wird (Ryffel and Lingott, 2000). Beim Menschen führt eine Mutation dieser Bindestelle zu MODY3 (Gragnoli et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein minimales Promotorfragment, bestehend aus einer HNF4-Bindestelle des HNF1 $\alpha$  Gens und der 3'-flankierenden Sequenz der Bindestelle mit einer TATA-Box und der Transkriptionsstartstelle, nicht ausreichend ist, um eine Expression des GFP-Reporters in transgenen *Xenopus* Larven zu steuern (Tabelle 8).

Die Erkenntnis, dass Insulatoren das Expressionsprofil eines Transgens beeinflussen können, indem sie Einflüsse der Integrationsstelle neutralisieren (Kapitel 4.6.1), spricht dafür, dass neben einem zellspezifischen Regulationselement und einem basalen Promotor ein Insulator vorhanden sein sollte, um eine Expression des Reportergens zu steuern. Es zeigte sich aber in der vorliegenden Arbeit, dass auch ein Flankieren dieses minimalen Promotorfragmentes mit einer doppelten Kopie des  $\beta$ -Globin Insulators des Huhns nicht ausreichte, um eine Expression des Reportergens in transgenen *Xenopus* Larven steuern zu können (Tabelle 9).

Bereits in Zellkulturanalysen konnte gezeigt werden, dass eine einzelne HNF4-Bindestelle für eine Aktivierung transfizierter Zellen nicht ausreichend ist. Da für eine Aktivierung mehrere HNF4-Bindestellen benötigt werden (Drewes et al., 1994), sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob ein minimales Promotorfragment, welches aus mehreren HNF4-Bindestellen und der 3'-flankierenden Sequenz der Bindestelle besteht, eine Expression von GFP in transgenen *Xenopus* Larven steuern kann.

## 4.9 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON INSULATOREN

Trotz zahlreicher Untersuchungen bezüglich regulatorischer Insulatoren in den letzten Jahren ist die Anzahl bereits identifizierter Insulatoren sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten relativ gering. Neben dem in der vorliegenden Arbeit oftmals angesprochenen  $\beta$ -Globin Insulator 5'-HS4 des Huhns (Chung et al., 1993; Chung et al., 1997; Pikaart et al., 1998), welcher den wohl am besten charakterisierten Insulator bei Vertebraten darstellt, konnten in der Zwischenzeit erst wenige Insulatoren bei Vertebraten identifiziert werden, welche die beiden klassischen Eigenschaften, Schutz vor chromosomalen Positionseffekten und „Enhancer Blocking“ Aktivität aufweisen. Zu diesen zählen zum Beispiel das Alu-Element als Bestandteil der LCR des humanen K18 Gens (Willoughby et al., 2000), die 5'-Region des humanen Apolipoproteins B (Antes et al., 2001; Kalos and Fournier, 1995) und eine Region des humanen  $\beta$ -Globin-Gens 5'-HS5 (Li and Stamatoyannopoulos, 1994; Li et al., 2002). Darüber hinaus konnten weitere Insulator-ähnliche Elemente bei Vertebraten gefunden werden, welche nur mit einer der beiden Eigenschaften eines Insulators assoziiert sind. Zu diesen gehören beim Menschen die 3'-Region des Apolipoproteins B (Kalos and Fournier, 1995), das  $\alpha 1$ -Antitrypsin Gen (Namciu et al., 1998), der BEAD Insulator (Zhong and Krangel, 1997), der HS2-6 Insulator (Zhong and Krangel, 1999), ein Insulator im DM1 locus (Filippova et al., 2001) und die 5'-Region des H19 Gens (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kaffer et al., 2000). Beim Huhn wurde ein weiteres Element in der 3'-Region des  $\beta$ -Globin locus identifiziert, welches mit Anti-Enhancer-Eigenschaften assoziiert ist (Saitoh et al., 2000) und beim Frosch werden die „Repeat Organizer“ zwischen den 40S rRNA Genen mit Insulatoraktivität verbunden (Robinett et al., 1997).

Die Aufführung der bislang in Vertebraten identifizierten Insulatoren oder Insulator-ähnlichen Regulationselemente machen deutlich, dass die Forschung diesbezüglich noch ziemlich am Anfang steht. Mit der Identifizierung eines Insulatorelementes im *Xenopus* HNF1 $\alpha$  Promotor, welches sowohl vor chromosomalen Positionseffekten schützt als auch „Enhancer Blocking“ Aktivität aufweist, konnte ein weiteres Insulatorelement bei Vertebraten identifiziert werden, welches die beiden klassischen Eigenschaften eines Insulators aufweist.

Obwohl die Rolle von Insulatoren als Regulationselemente seit Jahren bekannt ist, gibt es bislang nur wenige Hinweise auf ihre funktionelle Bedeutung im chromosomalen Kontext. Es wird angenommen, dass die meisten Insulatoren eine wichtige Funktion in der Regulation der Genexpression aufweisen, aber nur in den wenigsten Fällen ist ein direkter Hinweis für diese These gefunden worden. Ein Beispiel, an welchem die funktionelle Bedeutung von



Insulatoren gezeigt werden kann, stellen die elterlich geprägten Gene H19 und IGF-2 („Insulin-like Growth Factor 2“) dar (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000). Während H19 nur auf dem maternalen Chromosom exprimiert wird, exprimiert das paternale Chromosom ausschließlich IGF-2 (Horsthemke et al., 1999). Beide Gene werden über die „Imprined Control Region“ (ICR) kontrolliert, welche auf dem maternalen Chromosom unmethyliert, auf dem paternalen Chromosom jedoch methyliert ist. Der unterschiedliche Methylierungsgrad beeinflusst die Bindungsfähigkeit des DNA-Bindungsproteins CTCF an die entsprechenden Bindungsstellen, die in dieser Region identifiziert werden konnten (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Szabo et al., 2000). CTCF bindet auf dem maternalen Chromosom an die ICR und verhindert so die Aktivierung von IGF-2 durch die stromabwärts von H19 gelegenen Enhancer. Da eine Methylierung der DNA die Bindung von CTCF und somit die Insulatoraktivität der ICR verhindert, kann das Protein auf dem methylierten paternalen Chromosom nicht binden, so dass die Enhancer IGF-2 aktivieren können. Ein Defekt im Imprinting-Prozess kann zu verschiedenen Mißbildungen und Tumoren (Wilms Tumor) oder auch Erbkrankheiten wie Prader-Willi- und Angelman-Syndrom führen (Nicholls et al., 1998), was sowohl die funktionelle Bedeutung als auch die medizinische Relevanz dieser elterlichen Prägung und von Insulatoren aufzeigt.

Ein weiterer Hinweis für die funktionelle Rolle von Insulatoren in der Aufrechterhaltung der funktionellen Unabhängigkeit eines einzelnen Enhancers in komplexen eukaryotischen Genomen konnte durch Untersuchungen von Homeobox-Genen bei *Drosophila* erbracht werden. Der Bithorax-Komplex (BX-C) von *Drosophila* stellt eines der bekanntesten Cluster von Homeobox-Genen dar, welches die Ausbildung der hinteren Brustsegmente und des Hinterleibes reguliert und bei einer Größe von 300kb zahlreiche *cis*-regulatorische Elemente aufweist. Spezielle DNA-Elemente, Fab-7 und Fab-8, übernehmen die Funktion von Insulator-Elementen, indem sie den *cis*-regulatorischen Enhancer *iab-7* flankieren und somit die Enhancer *iab-7* und *iab-8* in der Abd-B-Domäne des BX-C voneinander trennen. Während der Abd-B Promotor durch den *iab-8* Enhancer aktiviert werden kann, verhindern Fab-7 und Fab-8 die Aktivierung des Abd-B Promotors durch *iab-7* (Hagstrom et al., 1996; Zhou et al., 1996; Zhou and Levine, 1999). Deletionen von Fab-7 oder Fab-8 führen zu einer Missexpression des Abd-B Homeogens (Galloni et al., 1993; Barges et al., 2000). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass diese Insulatoraktivität auch moduliert werden kann. Die Anwesenheit eines PTS-Elementes („Promoter-Targeting-Sequene“) erlaubt die Aktivierung des Abd-B Promotors durch *iab-7* (Zhou and Levine, 1999). Dieses Beispiel macht die funktionelle Bedeutung von Insulatorelementen in der Abschirmung einzelner *cis*-

regulatorischer Elemente deutlich, so dass diese Elemente unabhängig voneinander wirken können, obgleich das PTS-Element die Interaktion aller Elemente mit dem Promotor ermöglichen kann.

Die beschriebenen Beispiele weisen auf eine wichtige Funktion dieser Insulatoren als Regulationselemente hin. Zusammen mit anderen *cis*-agierenden Elementen wie Enhancern, LCRs und Silencern gewährleisten sie als dynamische Elemente eine korrekte Regulation der Genaktivität in komplexen eukaryotischen Genomen. Obgleich diese Regulationselemente seit Jahren das Interesse von Untersuchungen darstellen, liegen erst relativ wenige Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Insulatoren vor. Es wird deutlich, dass weitere Analysen dieser Insulatoren gleichzeitig auch zahlreiche neue Erkenntnisse über die Regulation der Genexpression und die Bedeutung *cis*-agierender Regulationselemente in komplexen Genomen liefern.

Trotz der bislang geringen Erkenntnisse können diese *cis*-agierenden Insulatorelemente zum Beispiel in Expressionsvektoren für Biotechnologie und Gentherapie genutzt werden, um eine hohe und stabile Genexpression zu erzielen. Voraussetzung für Gentherapieansätze ist eine essentielle, stabile Langzeitexpression der transduzierten Gene. Dies kann oftmals nicht erreicht werden, da die therapeutischen Gene zum einen aufgrund der zufälligen Integration ins zelluläre Genom Positionseffekten der chromosomalen Umgebung unterliegen, zum anderen führt de novo Methylierung retroviraler LTR-Sequenzen („long terminal repeats“) oftmals zur Inaktivierung der Genexpression (Hawley, 2001; Holmes-Son et al., 2001). Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften von Insulatoren, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins zu schützen, können diese Elemente helfen, die oben angesprochenen Limitationen zu überkommen (Neff et al., 1997; Rivella et al., 2000). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass der  $\beta$ -Globin Insulator 5'-HS4 des Huhns die Inaktivierung retroviraler Vektoren bei einer Integration ins Genom transgener Mäuse verhindern kann (Yao et al., 2003).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Expression des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  konnte in der vorliegenden Arbeit bei *Xenopus laevis* Larven unmittelbar vor der Metamorphose neben dem mesodermalen Mesonephros (persistierende Form der Niere bei Amphibien) auch in den entodermalen Geweben Darm, Leber und Pankreas nachgewiesen werden.

Während ein langes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-5949/-58) in transgenen *Xenopus laevis* Larven eine Expression sowohl in der mesodermalen Niere als auch in entodermalen Geweben auslöst, ist ein kurzes HNF1 $\alpha$  Promotorfragment (-594/-58) nicht ausreichend, um eine korrekte Expression des Transgens im *Xenopus* zu steuern. Durch das Einbringen unterschiedlicher HNF1 $\alpha$  Promotorfragmente als Transgen konnte der regulatorische Bereich im HNF1 $\alpha$  Promotor kartiert werden, welcher für eine korrekte Expression des Transgens verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass eine Deletion stromabwärts von Position -2589bp zu einem Verlust entodermaler Aktivität sowie zu einer transienten Mosaikexpression einzelner GFP-fluoreszierender Zellen in frühen Stadien der Larvalentwicklung führt.

Ein Flankieren des kurzen HNF1 $\alpha$  Promotorfragmentes (-594/-58) mit einer doppelten Kopie des  $\beta$ -Globin Insulators 5'-HS4 resultiert in einer korrekten Expression des Transgens sowohl in mesodermalen als auch in entodermalen Geweben, was auf ein regulatorisches Insulatorelement im HNF1 $\alpha$  Promotor deutet, welches den Promotor des Transgen vor Einflüssen des umliegenden Chromatins schützen kann, und so für eine korrekte Expression des Transgens verantwortlich ist.

Basierend auf einem in dieser Arbeit entwickelten Assay zum Nachweis der „Enhancer Blocking“ Aktivität des  $\beta$ -Globin Insulators 5'-HS4 des Huhns durch transiente Transfektion von HeLa-, HEK293- und FT02B-Zellen konnten zwei Fragmente im HNF1 $\alpha$  Promotor identifiziert werden, welche die Fähigkeit eines Insulators aufweisen, bei einer Lokalisierung zwischen einem Enhancer und einem Promotor die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer blockieren zu können. Diese Fragmente liegen in einem Bereich von Position -4036bp bis -2517bp, und damit stromaufwärts des Bereiches des HNF1 $\alpha$  Promotors, welcher mit dem Schutz vor chromosomalen Positionseffekten verbunden ist.

Die Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass die klassischen Eigenschaften des in dieser Arbeit identifizierten HNF1 $\alpha$  Insulators, Schutz vor chromosomalen Positionseffekten und

„Enhancer Blocking“ Aktivität, zwei separate Aktivitäten darstellen, welche in verschiedenen Bereichen des Promotors lokalisiert sind.

Mit Hilfe von Gelretardations-Kompetitionsexperimenten konnten potentielle Bindestellen für den multivalenten Transkriptionsfaktor CTCF, welche mit der „Enhancer Blocking“ Aktivität des  $\beta$ -Globin Insulators und anderer Vertebraten-Insulatoren assoziiert sind, im HNF1 $\alpha$  Promotor stromaufwärts von Position –2269bp identifiziert werden. Die CTCF-Bindestellen sind demnach nicht unmittelbar mit der „Enhancer Blocking“ Aktivität des HNF1 $\alpha$  Insulators verbunden, sondern sind vielmehr in einem Bereich des Promotors lokalisiert, welcher mit dem Schutz vor chromosomalen Positionseffekten assoziiert ist.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Adachi,Y., Kas,E., and Laemmli,U.K. (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* 8, 3997-4006.

Allan,J., Staynov,D.Z., and Gould,H. (1980). Reversible dissociation of linker histone from chromatin with preservation of internucleosomal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 885-889.

Allen,G.C., Spiker,S., and Thompson,W.F. (2000). Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43, 361-376.

Antes,T.J., Namciu,S.J., Fournier,R.E., and Levy-Wilson,B. (2001). The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry* 40, 6731-6742.

Ausubel,F.J., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A., and Struhl,K. (1989). *Curr. Protocols in Molecular Biology*.

Barges,S., Mihaly,J., Galloni,M., Hagstrom,K., Muller,M., Shanower,G., Schedl,P., Gyurkovics,H., and Karch,F. (2000). The Fab-8 boundary defines the distal limit of the bithorax complex iab-7 domain and insulates iab-7 from initiation elements and a PRE in the adjacent iab-8 domain. *Development* 127, 779-790.

Bartkowski,S., Zapp,D., Weber,H., Eberle,G., Zoidl,C., Senkel,S., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993). Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription factor LFB1 (HNF1) in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 421-431.

Baumhueter,S., Mendel,D.B., Conley,P.B., Kuo,C.J., Turk,C., Graves,M.K., Edwards,C.A., Courtois,G., and Crabtree,G.R. (1990). HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev.* 4, 372-379.

Beck,C.W. and Slack,J.M. (1999). Gut specific expression using mammalian promoters in transgenic *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 88, 221-227.

Bell,A.C. and Felsenfeld,G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 191-198.

Bell,A.C. and Felsenfeld,G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405, 482-485.

Bell,A.C., West,A.G., and Felsenfeld,G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387-396.

Bell,A.C., West,A.G., and Felsenfeld,G. (2001). Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* 291, 447-450.

Blumenfeld,M., Maury,M., Chouard,T., Yaniv,M., and Condamine,H. (1991). Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113, 589-599.

- Bode,J., Kohwi,Y., Dickinson,L., Joh,T., Klehr,D., Mielke,C., and Kohwi-Shigematsu,T. (1992). Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 255, 195-197.
- Bronchain,O.J., Hartley,K.O., and Amaya,E. (1999). A gene trap approach in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 9, 1195-1198.
- Buratowski,S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77, 1-3.
- Casey,E.S., Tada,M., Fairclough,L., Wylie,C.C., Heasman,J., and Smith,J.C. (1999). Bix4 is activated directly by VegT and mediates endoderm formation in *Xenopus* development. *Development* 126, 4193-4200.
- Chung,J.H., Bell,A.C., and Felsenfeld,G. (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 575-580.
- Chung,J.H., Whiteley,M., and Felsenfeld,G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74, 505-514.
- Cockerill,P.N. (1990). Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res.* 18, 2643-2648.
- Cockerill,P.N. and Garrard,W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44, 273-282.
- Cohen,S.N., Chang,A.C., and Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 2110-2114.
- Dang,Q., Auten,J., and Plavec,I. (2000). Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J. Virol.* 74, 2671-2678.
- De Simone,V., De Magistris,L., Lazzaro,D., Gerstner,J., Monaci,P., Nicosia,A., and Cortese,R. (1991). LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J.* 10, 1435-1443.
- Demartis,A., Maffei,M., Vignali,R., Barsacchi,G., and De Simone,V. (1994). Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 beta transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 47, 19-28.
- Drewes,T., Clairmont,A., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1994). Estrogen-inducible derivatives of hepatocyte nuclear factor-4, hepatocyte nuclear factor-3 and liver factor B1 are differently affected by pure and partial antiestrogens. *Eur. J. Biochem.* 225, 441-448.
- Dynan,W.S. and Tjian,R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316, 774-778.

Filippova,G.N., Thienes,C.P., Penn,B.H., Cho,D.H., Hu,Y.J., Moore,J.M., Klesert,T.R., Lobanenko,V.V., and Tapscott,S.J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat. Genet.* 28, 335-343.

Frazar,T.F., Weisbein,J.L., Anderson,S.M., Cline,A.P., Garrett,L.J., Felsenfeld,G., Gallagher,P.G., and Bodine,D.M. (2003). Variegated expression from the murine band 3 (AE1) promoter in transgenic mice is associated with mRNA transcript initiation at upstream start sites and can be suppressed by the addition of the chicken beta-globin 5' HS4 insulator element. *Mol. Cell Biol.* 23, 4753-4763.

Galloni,M., Gyurkovics,H., Schedl,P., and Karch,F. (1993). The bluetail transposon: evidence for independent cis-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. *EMBO J.* 12, 1087-1097.

Gaszner,M., Vazquez,J., and Schedl,P. (1999). The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes Dev.* 13, 2098-2107.

Gause,M., Morcillo,P., and Dorsett,D. (2001). Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the *Drosophila* cut gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins. *Mol. Cell Biol.* 21, 4807-4817.

Gerasimova,T.I., Byrd,K., and Corces,V.G. (2000). A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol. Cell* 6, 1025-1035.

Gerasimova,T.I. and Corces,V.G. (1996). Boundary and insulator elements in chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 185-192.

Gerasimova,T.I. and Corces,V.G. (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 92, 511-521.

Gerasimova,T.I., Gdula,D.A., Gerasimov,D.V., Simonova,O., and Corces,V.G. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 82, 587-597.

Geyer,P.K. and Clark,I. (2002). Protecting against promiscuity: the regulatory role of insulators. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 2112-2127.

Geyer,P.K. and Corces,V.G. (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* 6, 1865-1873.

Ghosh,D., Gerasimova,T.I., and Corces,V.G. (2001). Interactions between the Su(Hw) and Mod(mdg4) proteins required for gypsy insulator function. *EMBO J.* 20, 2518-2527.

Gragnoli,C., Lindner,T., Cockburn,B.N., Kaisaki,P.J., Gragnoli,F., Marozzi,G., Bell,G.I. (1997). Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46, 1648-1651.

- Hagstrom,K., Muller,M., and Schedl,P. (1996). Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the drosophila bithorax complex. *Gene Develop.* *10*, 3202-3215.
- Hark,A.T., Schoenherr,C.J., Katz,D.J., Ingram,R.S., Levorse,J.M., and Tilghman,S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* *405*, 486-489.
- Hart,C.M., Cuvier,O., and Laemmli,U.K. (1999). Evidence for an antagonistic relationship between the boundary element-associated factor BEAF and the transcription factor DREF. *Chromosoma* *108*, 375-383.
- Hart,C.M., Zhao,K., and Laemmli,U.K. (1997). The scs' boundary element: characterization of boundary element-associated factors. *Mol. Cell Biol.* *17*, 999-1009.
- Hawley,R.G. (2001). Progress toward vector design for hematopoietic stem cell gene therapy. *Curr. Gene Ther.* *1*, 1-17.
- Holdridge,C. and Dorsett,D. (1991). Repression of hsp70 heat shock gene transcription by the suppressor of hairy-wing protein of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* *11*, 1894-1900.
- Holewa,B., Pogge v.Strandmann,E., Zapp,D., Lorenz,P., and Ryffel,G.U. (1996). Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1). *Mech. Dev.* *54*, 45-57.
- Holmes-Son,M.L., Appa,R.S., and Chow,S.A. (2001). Molecular genetics and target site specificity of retroviral integration. *Adv. Genet.* *43:33-69.*, 33-69.
- Horsthemke,B., Surani,A., James,T., and Ohlsson,R. (1999). The mechanisms of genomic imprinting. *Results Probl. Cell Differ.* *25:91-118.*, 91-118.
- Huang,H. and Brown,D.D. (2000a). Overexpression of *Xenopus laevis* growth hormone stimulates growth of tadpoles and frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 190-194.
- Huang,H. and Brown,D.D. (2000b). Prolactin is not a juvenile hormone in *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 195-199.
- Huang,H., Marsh-Armstrong,N., and Brown,D.D. (1999). Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 962-967.
- Kaffer,C.R., Srivastava,M., Park,K.Y., Ives,E., Hsieh,S., Batlle,J., Grinberg,A., Huang,S.P., and Pfeifer,K. (2000). A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 locus. *Genes Dev.* *14*, 1908-1919.
- Kalos,M. and Fournier,R.E. (1995). Position-independent transgene expression mediated by boundary elements from the apolipoprotein B chromatin domain. *Mol. Cell Biol.* *15*, 198-207.



- Kanduri,C., Pant,V., Loukinov,D., Pugacheva,E., Qi,C.F., Wolffe,A., Ohlsson,R., and Lobanenko,V.V. (2000). Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr. Biol.* *10*, 853-856.
- Kas,E., Izaurralde,E., and Laemmli,U.K. (1989). Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA).oligo(dT) tracts. *J. Mol. Biol.* *210*, 587-599.
- Kellum,R. and Schedl,P. (1991). A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* *64*, 941-950.
- Kellum,R. and Schedl,P. (1992). A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol. Cell Biol.* *12*, 2424-2431.
- Klehr,D., Maass,K., and Bode,J. (1991). Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* *30*, 1264-1270.
- Knox,B.E., Schlueter,C., Sanger,B.M., Green,C.B., and Besharse,J.C. (1998). Transgene expression in *Xenopus* rods. *FEBS Lett.* *423*, 117-121.
- Kornberg,R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* *46*:931-54., 931-954.
- Krieg,P.A., Zorn,A., Ovsenek,N., and Johnson,A. (1993). Gene activation in response to neural induction. *Cell Mol. Biol. Res.* *39*, 377-383.
- Kroll,K.L. and Amaya,E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* *122*, 3173-3183.
- Kroll,K.L. and Gerhart,J.C. (1994). Transgenic *X. laevis* embryos from eggs transplanted with nuclei of transfected cultured cells. *Science* *266*, 650-653.
- Kulkarni,R.N. and Okada,T. (2002). Tissue-specific targeting of the insulin receptor gene. *Endocrine.* *19*, 257-266.
- Kuo,C.J., Conley,P.B., Hsieh,C.L., Francke,U., and Crabtree,G.R. (1990). Molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of mouse hepatocyte nuclear factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9838-9842.
- Labrador,M. and Corces,V.G. (2002). Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell* *111*, 151-154.
- Lerchner,W., Latinkic,B.V., Remacle,J.E., Huylebroeck,D., and Smith,J.C. (2000). Region-specific activation of the *Xenopus* Brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. *Development* *127*, 2729-2739.
- Li,Q. and Stamatoyannopoulos,G. (1994). Hypersensitive site 5 of the human beta locus control region functions as a chromatin insulator. *Blood* *84*, 1399-1401.

- Li,Q., Zhang,M., Han,H., Rohde,A., and Stamatoyannopoulos,G. (2002). Evidence that DNase I hypersensitive site 5 of the human beta-globin locus control region functions as a chromosomal insulator in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 30, 2484-2491.
- Litt,M.D., Simpson,M., Recillas-Targa,F., Prioleau,M.N., and Felsenfeld,G. (2001). Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* 20, 2224-2235.
- Marsh-Armstrong,N., Huang,H., Berry,D.L., and Brown,D.D. (1999). Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14389-14393.
- Martens,J.H.A., Verlaan,M., Kalkhoven,M., Dorsman,J.C., and Zantema,A. (2002). Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-Scaffold Attachment Factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol. Cell Biol.* 22, 2598-2606.
- McKnight,S. and Tjian,R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46, 795-805.
- Mielke,C., Kohwi,Y., Kohwi-Shigematsu,T., and Bode,J. (1990). Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* 29, 7475-7485.
- Mirkovitch,J., Mirault,M.E., and Laemmli,U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39, 223-232.
- Mitchell,S.M. and Frayling,T.M. (2002). The role of transcription factors in maturity-onset diabetes of the young. *Mol. Genet. Metab* 77, 35-43.
- Muller,H. (1930). Types of visible variation induced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics* 22, 299-334.
- Nabirochkin,S., Ossokina,M., and Heidmann,T. (1998). A nuclear matrix/scaffold attachment region co-localizes with the gypsy retrotransposon insulator sequence. *J. Biol. Chem.* 273, 2473-2479.
- Namciu,S.J., Blochlinger,K.B., and Fournier,R.E. (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 18, 2382-2391.
- Neff,T., Shotkoski,F., and Stamatoyannopoulos,G. (1997). Stem cell gene therapy, position effects and chromatin insulators. *Stem Cells* 15 Suppl 1:265-71., 265-271.
- Nicholls,R.D., Saitoh,S., and Horsthemke,B. (1998). Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet.* 14, 194-200.
- Nieuwkoop,P.D. and Faber,J. (1975). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co).
- Nieuwkoop,P.D. and Faber,J. (1956). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland, Amsterdam.

- Offield,M.F., Hirsch,N., and Grainger,R.M. (2000). The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. *Development* 127, 1789-1797.
- Ohlsson,R., Renkawitz,R., and Lobanenko,V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 17, 520-527.
- Olson,E.N. and Rosenthal,N. (1994). Homeobox genes and muscle patterning. *Cell* 79, 9-12.
- Ovsenek,N., Zorn,A.M., and Krieg,P.A. (1992). A maternal factor, OZ-1, activates embryonic transcription of the *Xenopus laevis* GS17 gene. *Development* 115, 649-655.
- Owen,K. and Hattersley,A.T. (2001). Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 15, 309-323.
- Phi-Van,L. and Stratling,W.H. (1996). Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects. *Biochemistry* 35, 10735-10742.
- Pikaart,M.J., Recillas-Targa,F., and Felsenfeld,G. (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* 12, 2852-2862.
- Pogge v.Strandmann,E., Nastos,A., Holewa,B., Senkel,S., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1997). Patterning the expression of a tissue-specific transcription factor in embryogenesis: HNF1 alpha gene activation during *Xenopus* development. *Mech. Dev.* 64, 7-17.
- Poljak,L., Seum,C., Mattioni,T., and Laemmli,U.K. (1994). SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucleic Acids Res.* 22, 4386-4394.
- Pondel,M.D., Jagger,C., Hebden,C., Partington,G., and Mould,R. (2002). Transcriptional regulation of the calcitonin receptor gene. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 423-427.
- Potts,W., Tucker,D., Wood,H., and Martin,C. (2000). Chicken beta-globin 5'HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1015-1018.
- Prioleau,M.N., Nony,P., Simpson,M., and Felsenfeld,G. (1999). An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken beta-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.* 18, 4035-4048.
- Razin,A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* 17, 4905-4908.
- Recillas-Targa,F., Bell,A.C., and Felsenfeld,G. (1999). Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14354-14359.

- Recillas-Targa,F., Pikaart,M.J., Burgess-Beusse,B., Bell,A.C., Litt,M.D., West,A.G., Gaszner,M., and Felsenfeld,G. (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6883-6888.
- Rivella,S., Callegari,J.A., May,C., Tan,C.W., and Sadelain,M. (2000). The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J. Virol.* 74, 4679-4687.
- Robinett,C.C., O'Connor,A., and Dunaway,M. (1997). The repeat organizer, a specialized insulator element within the intergenic spacer of the *Xenopus* rRNA genes. *Mol. Cell Biol.* 17, 2866-2875.
- Roseman,R.R., Pirrotta,V., and Geyer,P.K. (1993). The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J.* 12, 435-442.
- Ryffel,G.U. and Lingott,A. (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1alpha promoter in transgenic *Xenopus*. *Mech. Dev.* 90, 65-75.
- Saitoh,N., Bell,A.C., Recillas-Targa,F., West,A.G., Simpson,M., Pikaart,M., and Felsenfeld,G. (2000). Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken beta-globin domain. *EMBO J.* 19, 2315-2322.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York).
- Schubeler,D., Mielke,C., Maass,K., and Bode,J. (1996). Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* 35, 11160-11169.
- Schulz, J. (1936). Variegation in *Drosophila* and the insert genome region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 22, 27-33.
- Sladek,F.M. (1994). Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor.* 4, 64.
- Sladek,F.M. and Darnell,J.E. (1992). Mechanisms of liver-specific gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 256-259.
- Sparrow,D.B., Cai,C., Kotecha,S., Latinkic,B., Cooper,B., Towers,N., Evans,S.M., and Mohun,T.J. (2000a). Regulation of the tinman Homologues in *Xenopus* Embryos. *Dev. Biol.* 227, 65-79.
- Sparrow,D.B., Latinkic,B., and Mohun,T.J. (2000b). A simplified method of generating transgenic *Xenopus*. *Nucleic Acids Res.* 28, E12.
- Stein,G.S., Stein,J.L., van Wijnen,A.J., and Lian,J.B. (1994). Histone gene transcription: a model for responsiveness to an integrated series of regulatory signals mediating cell cycle control and proliferation/differentiation interrelationships. *J. Cell Biochem.* 54, 393-404.

- Stief,A., Winter,D.M., Stratling,W.H., and Sippel,A.E. (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341, 343-345.
- Stunkel,W., Huang,Z., Tan,S.H., O'Connor,M.J., and Bernard,H.U. (2000). Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J. Virol.* 74, 2489-2501.
- Szabo,P.E., Tang,S.H., Rentsendorj,A., Pfeifer,G.P., and Mann,J.R. (2000). Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function [In Process Citation]. *Curr. Biol.* 10, 607-610.
- Tronche,F. and Yaniv,M. (1992). HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14, 579-587.
- Weber,H., Strandmann,E.P., Holewa,B., Bartkowski,S., Zapp,D., Zoidl,C., and Ryffel,G.U. (1996). Regulation and function of the tissue-specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1) during *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 297-304.
- West,A.G., Gaszner,M., and Felsenfeld,G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16, 271-288.
- Willoughby,D.A., Vilalta,A., and Oshima,R.G. (2000). An Alu element from the K18 gene confers position-independent expression in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 759-768.
- Yao,S., Osborne,C.S., Bharadwaj,R.R., Pasceri,P., Sukonnik,T., Pannell,D., Recillas-Targa,F., West,A.G., and Ellis,J. (2003). Retrovirus silencer blocking by the cHS4 insulator is CTCF independent. *Nucleic Acids Res.* 31, 5317-5323.
- Yasuda,G.K. and Schubiger,G. (1992). Temporal regulation in the early embryo: is MBT too good to be true? *Trends Genet.* 8, 124-127.
- Zapp,D., Bartkowski,S., Holewa,B., Zoidl,C., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 6416-6426.
- Zernicka-Goetz,M., Pines,J., Ryan,K., Siemering,K.R., Haseloff,J., Evans,M.J., and Gurdon,J.B. (1996). An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. *Development* 122, 3719-3724.
- Zhao,K., Hart,C.M., and Laemmli,U.K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* 81, 879-889.
- Zhong,X.P. and Krangel,M.S. (1997). An enhancer-blocking element between alpha and delta gene segments within the human T cell receptor alpha/delta locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 5219-5224.
- Zhong,X.P. and Krangel,M.S. (1999). Enhancer-blocking activity within the DNase I hypersensitive site 2 to 6 region between the TCR alpha and Dad1 genes. *J. Immunol.* 163, 295-300.

Zhou,J. and Levine,M. (1999). A novel cis-regulatory element, the PTS, mediates an anti-insulator activity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 99, 567-575.

Zhou,J.M., Barolo,S., Szymanski,P., and Levine,M. (1996). The fab-7 element of the bithorax complex attenuates enhancer- promoter interactions in the *drosophila* embryo. *Gene Develop.* 10, 3195-3201.

Zlatanova,J.S. and van Holde,K.E. (1992). Chromatin loops and transcriptional regulation. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2, 211-224.



# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel, der mir die Chance gegeben hat, an diesem interessanten Projekt zu arbeiten. Ich danke ihm für die intensive Betreuung der Arbeit und besonders dafür, dass seine Bürotür immer offen stand für Fragen, Sorgen und Anregungen.

Ich danke weiterhin den Menschen, mit denen ich während der letzten Jahre einen Großteil meiner Zeit verbracht habe, den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe III (Entwicklungsbiologie). Der fröhliche und kollegiale Umgang in der Arbeitsgruppe sorgte immer wieder für ein besonders gutes Arbeitsklima, das ich so stets in guter Erinnerung behalten werde.

Herrn Kenneth Simon danke ich dafür, dass er Sorgen und Leid (und davon gab es wahrlich reichlich...) beim Injizieren mit mir geteilt hat.

Frau Gülüzar Turan danke ich für ihr Engagement bei der Einführung in die Welt der Zellkultur und für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Transfektion zahlreicher Zellen.

Das Arbeiten im Isotopenlabor mit radioaktiven Substanzen war sicherlich keine Wohltat. Denn wer möchte schon gerne ein „Strahlemann“ auf Lebenszeit sein. Frau Dr. Silvia Bohn und Frau Tanja Arndt haben diese unangenehme Tätigkeit durch fachliche Kenntnis und kollegiale Unterstützung sicherlich erträglicher gemacht.

Brauchte ich einmal einen schlaun Ratschlag, konnte ich mich stets an unseren Postdoc Frau Dr. Heike Thomas wenden, die mir mit wertvollen Tipps konstruktiv und fachkundig weiterhelfen konnte.

Für die besonders engagierte Pflege und Versorgung der Xenopus-Frösche danke ich Herrn Kai Jüde, Herrn Stefan Gooßes und Herrn David Nickol.

Frau Sabine Senkel konnte aufgrund ihrer langjährigen Erfahrung und Präsenz mit kompetenten Anregungen dienen.



Meinen Leidensgenossinnen auf dem Weg zur Promotion Frau Silke Erdmann, Frau Belén Lucas und Frau Guizhi Wu danke ich für ihren guten Zuspruch.

Mit Herrn Dr. Christoph Waldner und Herrn Rafael Bordes-Alonso habe ich zwar nur einen kurzen Weg beschritten, möchte ihnen aber an dieser Stelle viel Erfolg bei der Arbeit und dem K(r)ampf mit den Xenopus-Fröschen wünschen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Lothar Vaßen, der mir bei der Bedienung des PhosphorImagers hilfreich zur Seite stand.

Ohne sterile Lösungen und autoklavierte Labormaterialien geht im Labor nichts. Daher gilt mein Dank auch Frau Renate Dreher und Frau Maria Eynck.

Das Arbeiten mit Computern kann bekanntlich sehr nervig und frustrierend sein. Herr Klaus Lennartz bewahrte in diesen Krisenzeiten meist einen kühlen Kopf und konnte schnell und kompetent die Fehler beseitigen.

Ist mal wieder ein Gerät explodiert oder hat eine defekte Sicherung eine komplette Versuchsreihe lahmgelegt...3387...und Herr Hans Zieren war zur Stelle.

Herrn Michael Derda danke ich für die schnelle Bearbeitung meiner Laborbedarf-Bestellungen. Darüber hinaus möchte ich ihm besonders für seine Geduld in der letzten Zeit danken, in der er meinen Nervenkrieg bezüglich der Verfassung dieser Arbeit erleiden musste.

Von Herzen danke ich meiner Familie für 27 Jahre uneingeschränkte Unterstützung, die mir immer neue Kraft gegeben und stets an mich geglaubt hat.

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Daniela Plitzko  
Geburtsdatum: 23. April 1976  
Geburtsort: Essen, Deutschland  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## SCHULAUSBILDUNG

1982 - 1986: Cranach-Grundschule in Essen, Deutschland  
1986 - 1995: BMV-Gymnasium in Essen, Deutschland  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## BERUFSAUFBILDUNG

10/1995 - 05/2000: Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum  
04/1999 – 05/2000: Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellphysiologie, Ruhr-Universität Bochum, Prof. Dr. Dr. H. Hatt; Thema: “Silent synapses in differentiating rat neocortical neurons.”  
31.05.2000: Abschluss: Diplom-Biologin  
  
08/2000-10/2003: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen in der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie von Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

Essen, den 02.10.2003

Daniela Plitzko

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema: “Differentielle Aktivität des HNF1 $\alpha$  Insulators im transgenen Xenopus und in Zellkulturen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Daniela Plitzko befürworte.

Essen, den 02.10.2003

Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 02.10.2003

Daniela Plitzko

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt wurde.

Essen, den 02.10.2003

Daniela Plitzko